

Technologische Bewertung von Peptid-Mikroarrays als Methode der serologischen Diagnostik

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dipl.-Chem. Juliane Lück

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Dr. Michal Or-Guil
2. Prof. Dr. Achim Kramer
3. Prof. Dr. Wolfgang Höhne

eingereicht am: 21.07.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2012

Abstract

The humoral immune response to a pathogen is associated with specific changes in the antibody repertoire. Because of the enormous complexity of the immune system, a quantitative determination of this process, i.e. the analysis of antigen-antibody interactions requires high-throughput measuring tools, such as the peptide microarray technology. Although microarrays are frequently used for serological diagnostics and identification of molecular disease markers, there are few reports that determine the technological reliability of peptide microarray studies. The lack of standardized production and hybridization conditions causes an enormous technological variability of peptide microarray measurements. The aim of this work is to elaborate quality criteria for antibody-peptide binding measurements using the peptide microarray technology with the objective to optimize this high-throughput method for quantitative and qualitative binding assays.

By using a model system, the dissociation constants of antibody-peptide complexes are systematically compared with obtained signal intensities. We have chosen a system of binding partners composed of the anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and an array of 26 different peptides for which the CB4-1 binding affinity has independently been measured by surface plasmon resonance (SPR) binding assays. The accuracy of signal intensity (SI) measurements is characterized by correlating SI with the dissociation constant (K_D) using a phenomenological model that is derived from the mass action law. It is shown that SIs obtained by probing peptide microarrays accurately reflect the dissociation constants of the antibody-peptide complexes. In addition, a method is developed that enables to assign a peptide to one of two binding affinity classes by the measured signal intensity.

Furthermore, a method that does not require any *a priori* knowledge about specific antigens, involving the measurement of antibody binding profiles on random peptide libraries, is established. By means of experiments with affinity-matured monoclonal antibodies derived from human blood IgG⁺ memory B cells, for which the reactivity has independently been measured by Tiller *et al.*, it is first demonstrated that random peptide libraries are a powerful tool for visualization and measuring antibody polyreactivity. Moreover, experiments with antibody mixtures in serum compared to single monoclonal antibodies have shown that antibodies strongly influence each other with regard to their polyreactivity.

The assignment of serum-antibody binding profiles using random peptide microarrays for the purpose of serological diagnostics constitutes a major part of this work. Therefore, the technological influencing factors to the measured signal intensity were firstly determined and an appropriate experimental protocol is provided. By means of various experiments, the microarray batch, the peptide library, the blocking procedure as well as the data acquisition method are analyzed in terms of their contribution to the variability of antibody-peptide binding assays. Special attention is laid on the detection system and its influence on the signal intensity. A method based on the signal-to-noise ratio of each measured spot was developed to detect false positive signals. Furthermore, experiments with mixtures of different secondary antibodies reveal that cross-reactivity is not negligible in some detection systems. Optimizing all examined influencing factors provides a basis for a significant reduction of technological variability and enables the extraction of high-quality data from peptide microarray experiments.

Finally, by means of three sample data sets, the ability of random peptide microarrays to serve as method of serological diagnosing infectious diseases, autoimmune diseases and cancer is demonstrated. Several statistical methods including feature selection are applied to classify and predict healthy and diseased individuals. By means of feature selection, the peptides that are exceptionally appropriate to discriminate between the investigated groups are identified. We emphasize that the found peptides do not necessarily have to be related to antigens in order to serve as potential diagnostic markers. This study attaches special importance to the reliability and robustness of extracted microarray data. Several experiments prove that the diagnostic reliability is not affected by fluctuations in the data sets caused for example by genetic differences.

This thesis indicates present problems of the peptide microarray technology and presents further developments on the way to minimal-invasive serological diagnostics that do not require any *a priori* knowledge about antigens, and thus about the investigated diseases.

Zusammenfassung

Die humorale Immunantwort eines Organismus auf ein Pathogen äußert sich in einer Veränderung des Antikörperrepertoires. Eine quantitative Untersuchung dieses Prozesses durch die Analyse von Antigen-Antikörper-Interaktionen oder die Identifizierung Pathogen-spezifischer Marker erfordert aufgrund der enormen Komplexität des Immunsystems, die Verwendung von Hochdurchsatztechniken, wie Protein- oder Peptid-Mikroarrays. Obwohl diese Technologie bereits breite Anwendung bei der Identifizierung von Biomarkern und zur serologischen Diagnose gefunden hat, gibt es bisher nur wenige Studien, die die Verlässlichkeit von Mikroarray-Bindungsmessungen untersuchen. Aufgrund des Fehlens standardisierter technologischer Bedingungen zur Herstellung und Hybridisierung von Peptid-Mikroarrays, unterliegt die Messung von Antigen-Antikörper-Interaktionen einer außerordentlich großen Variabilität. In dieser Arbeit werden Bewertungskriterien für die Qualität von Antikörper-Peptid-Bindungsstudien unter Verwendung der Peptid-Mikroarraytechnologie herausgearbeitet, mit dem Ziel, diese Hochdurchsatzmethode für qualitative und quantitative Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen zu optimieren.

Anhand eines Modellsystems, das aus dem monoklonalen anti-p24 (HIV-1) Antikörper CB4-1 und 26 verschiedenen Peptiden, die mit unterschiedlicher Affinität an CB4-1 binden, besteht, werden systematisch die Bindungsdissoziationskonstanten der jeweiligen Antikörper-Peptid-Komplexe mit den durch Peptid-Mikroarray-Bindungsmessungen erhaltenen Signalintensitäten verglichen. Ein phänomenologisches Modell, das vom Massenwirkungsgesetz abgeleitet ist, dient der Bestimmung der Genauigkeit von Signalintensitätsmessungen. Es wird gezeigt, dass die gemessenen Signalintensitäten die Bindungsdissoziationskonstante durch das Modell gut wiedergeben. Außerdem wird eine Methode dargestellt, die eine qualitative Bestimmung der Bindungsaffinität, d.h. die Klassifizierung eines Peptids als Binder oder Nichtbinder, ermöglicht.

Darüber hinaus wird die Messung von Antikörperbindungsprofilen gegenüber Zufallspeptidbibliotheken, als eine Klassifizierungsmethode, die kein *a priori* Wissen voraussetzt, etabliert. Es kann erstmals gezeigt werden, dass anhand von Zufallspeptid-Mikroarray-Bindungsexperimenten mit affinitätsgereiften monoklonalen Antikörpern, die von humanen IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen abstammen, und deren Reaktivität von Tiller *et al.* bestimmt wurde, die Polyreaktivität monoklonaler Antikörper gemessen werden kann. Des Weiteren haben Experimente mit Antikörpermischungen in Serum im Vergleich zu einzelnen monoklonalen Antikörpern gezeigt, dass Antikörper sich gegenseitig stark hinsichtlich ihrer Polyreaktivität beeinflussen.

In dieser Arbeit wird die Messung von Serumantikörperbindungsprofilen gegenüber Zufallspeptidbibliotheken als Methode der serologischen Diagnostik verwendet. Hierzu werden zunächst die technologischen Einflussfaktoren auf die gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten ermittelt und ein geeignetes experimentelles Protokoll herausgearbeitet. Durch zahlreiche Experimente wird der jeweilige Beitrag der Mikroarraycharge, der Peptidbibliothek, des Blockierungsverfahrens, der Probenkonzentration sowie des Datengewinnungsprozesses zur Variabilität von Serumantikörper-Peptid-Bindungsmessungen analysiert. Im besonderen Fokus steht die Rolle des Detektionssystems und dessen Einfluss auf die gemessene Signalintensität. Der Anteil unspezifischer Sekundärankörperbindung wird ermittelt und ein Verfahren entwickelt, das falsch-positive Signale von der Datenanalyse ausschließt. Ferner wird die Kreuzreaktivität

von Sekundärantikörpermischungen in verschiedenen Detektionssystemen untersucht. Die Optimierung aller untersuchten experimentellen Einflussfaktoren ermöglicht die Gewinnung qualitativ hochwertiger Bindungsdaten.

Anhand dreier Beispieldatensätze wird die serologische Diagnose von Infektionskrankheiten, Autoimmunkrankheiten und von Krebs mittels Zufallspeptid-Mikroarrays demonstriert. Mithilfe von Merkmalsselektion werden Peptide selektiert, die besonders geeignet sind, um zwischen gesunden und kranken Individuen zu unterscheiden. Es wird gezeigt, dass diese Peptide nicht biologisch relevant sein müssen, um als spezifische Biomarker einer Krankheit zu fungieren. Besondere Bedeutung wird der Untersuchung der Zuverlässigkeit und Robustheit der Methode gegenüber schwankenden experimentellen Bedingungen beigemessen. So wird experimentell gezeigt, dass die diagnostische Zuverlässigkeit beispielsweise nicht durch genetische Unterschiede beeinträchtigt wird.

Die vorliegende Arbeit gibt Aufschluss über vorhandene Probleme der Mikroarray-Technologie, stellt Lösungsansätze vor und arbeitet bedeutende Weiterentwicklungen auf dem Weg hin zu einer minimal-invasiven serologischen Diagnostik heraus, die kein *a priori* Wissen über Antigene voraussetzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Antigene	2
1.1.2	Antikörper	2
1.1.3	Diversität des Antikörper-Repertoires	4
1.1.4	Antikörpererkennung	5
1.2	Immunologische Testverfahren	7
1.2.1	Hochdurchsatztechniken	8
1.2.2	Protein-Mikroarrays	8
1.2.3	Peptid-Mikroarrays	9
1.2.4	Technologische Variabilität	11
1.2.5	Verwendung von Mikroarrays	11
1.3	Zufallspeptidbibliotheken und Antikörperbindungsstudien	13
1.4	Charakterisierung ausgewählter Krankheiten	13
1.4.1	Nematoden und Infektionen mit <i>H. polygyrus</i>	13
1.4.2	Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	13
1.4.3	Humanes Astrozytom	14
1.5	Diagnostik mit Peptid-Mikroarrays	15
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Geräte und Chemikalien	21
3.2	Mikroarrays	22
3.3	Antikörper und Sekundärantikörper	22
3.4	Puffer und Lösungen	23
3.5	Kits	25
3.6	Seren	25
3.6.1	Seren von <i>H. polygyrus</i> -infizierten Mäusen	25
3.6.2	Seren von Fc γ RIIB ^{-/-} .B6-Mäusen	25
3.6.3	Seren von Astrozytompatienten	26
3.7	Quantifizierung von Serum-IgM	26
3.8	Herstellung monoklonaler Antikörper	27
3.8.1	Transformation	27
3.8.2	Insert-Überprüfung	27
3.8.3	Gelelektrophorese	28

3.8.4	Plasmid Präparation	28
3.8.5	Antikörperexpression	28
3.8.6	IgG-ELISA des Zellüberstands	29
3.8.7	IgG-Aufreinigung	29
3.8.8	IgG-ELISA der aufgereinigten rekombinanten Antikörper	29
3.8.9	SDS-PAGE	30
3.9	Antikörper Konjugation	30
3.10	Glasträger	31
3.11	Herstellung von Mikroarrays	31
3.12	Peptidbibliotheken	31
3.12.1	CB4-1 Peptidbibliothek	31
3.12.2	Zufallspeptidbibliotheken	32
3.13	Inkubation von Peptidmikroarrays	33
3.13.1	Manuelle Inkubation	33
3.13.2	Vollautomatische Inkubation	34
3.14	Messung von Signalintensitäten	34
3.15	Datenprozessierung	35
3.15.1	Eliminierung falschpositiver Signale	35
3.16	Statistische Datenanalyse	35
3.16.1	Korrelationskoeffizienten	35
3.16.2	Bestimmung von Normalverteilung	35
3.16.3	Hauptkomponentenanalyse (PCA)	35
3.16.4	Lineare Diskriminanten Analyse (LDA)	35
3.16.5	Sensitivität und Spezifität	36
3.16.6	Merkmalsselektion und Kreuzvalidierung	36
3.16.7	Signifikanz der Klassifizierung und Diagnose mit P-SVM	36
3.16.8	Epitopsuche - BLAST	37
4	Ergebnisse und Diskussion I: Mikroarray-Technologie	39
4.1	Analyse von Bindungsprofilen monoklonaler Antikörper gegenüber Epi- toppeptidbibliotheken	39
4.1.1	Reproduzierbarkeit der Messung von Antikörper-Peptid-Interak- tionen	39
4.1.2	Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays	43
4.1.3	Stabilität peptidassoziierter Signalintensitäten bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen	46
4.1.4	Quantitative Bestimmung von Affinität mittels Peptid-Mikroarrays	47
4.1.5	Qualitative Bestimmung von Affinität mittels Peptid-Mikroarrays .	49
4.2	Analyse von Serumantikörperbindungsprofilen auf Zufallspeptidbibliotheken	52
4.2.1	Technologische und experimentelle Einflussfaktoren	52
4.2.2	Messung der Signalintensität und Datenoptimierung	63
4.2.3	Eigenschaften und Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten . . .	65

4.3	Messung von Polyreaktivität monoklonaler Antikörper mit Zufallspeptidbibliotheken auf Mikroarrays	69
4.3.1	Antikörper-Polyreaktivität	70
4.3.2	Polyreaktivität von monoklonalen Antikörpern und Antikörpermischungen in Serum	72
4.4	Diskussion	75
5	Ergebnisse und Diskussion II: Anwendung zur serologischen Diagnose	83
5.1	Unterscheidung der Antikörperbindungsprofile von gesunden und <i>H.polygyrus</i> -infizierten Mäusen	83
5.1.1	Merkmalsselektion und Klassifizierung von gesunden und <i>H.polygyrus</i> -infizierten Individuen	84
5.1.2	Diagnose der <i>H.polygyrus</i> -Infektion	85
5.1.3	Bedeutung selektierter Peptide	85
5.2	Unterscheidung der Antikörper-Bindungsprofile von gesunden und autoimmun Mäusen	87
5.2.1	Hauptkomponentenanalyse	87
5.2.2	Diagnose von Autoimmunkrankheiten anhand spezifischer Biomarker	88
5.2.3	Auftrennung von gesunden und Fc γ RIIB ^{-/-} .B6-Mäusen aufgrund genetischer oder immunologischer Unterschiede?	90
5.2.4	Bedeutung selektierter Peptide	91
5.3	Unterscheidung von Serumantikörperbindungsprofilen zur Diagnose primärer Hirntumore	92
5.3.1	Patienten und experimenteller Aufbau	92
5.3.2	Dateneigenschaften	93
5.3.3	Hauptkomponentenanalyse	95
5.3.4	Bestimmung des Grades primärer Hirntumore	95
5.4	Diskussion	97
6	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis	143
	Abbildungsverzeichnis	157
	Tabellenverzeichnis	159

1 Einleitung

Durch die zunehmend komplexer gewordenen Fragestellungen in der naturwissenschaftlichen Forschung, erfährt diese derzeit einen grundlegenden Wandel. Statt der bisherigen strikten Trennung der Wissenschaften Chemie, Physik, Biologie und Medizin ist die Vorgehensweise in der Forschung immer mehr durch interdisziplinäre Ansätze geprägt. So können z.B. chemisch modifizierte Proteine fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden und dienen so der Untersuchung zellbiologischer Vorgänge. Vor allem komplexe biologische Prozesse, wie sie sich beispielsweise bei der Immunabwehr abspielen, können daher mittlerweile in molekularer Auflösung verstanden werden.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk, das mit Organen, Immunzellen und anderen Komponenten an der Regulation sämtlicher Körperfunktionen beteiligt ist. Die primäre Funktion des Immunsystems ist die Erkennung und Zerstörung von Bakterien, Viren und anderen Parasiten, die von außen in den Organismus eingedrungen sind. Für diesen Zweck besitzt es die Fähigkeit, fremde von eigenen Molekülen zu unterscheiden. Versagt dieser Mechanismus und reagiert das Immunsystem gegen Zellen und Moleküle des eigenen Körpers, können Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, die Folge sein [140]. Das Immunsystem besteht aus einer spezifischen und einer unspezifischen Immunabwehr, die sich bei einer Immunantwort gegenseitig ergänzen [77].

Das unspezifische Immunsystem ist in der Lage Krankheitserreger (Pathogene) bereits beim ersten Kontakt unschädlich zu machen, man nennt es daher auch das angeborene Immunsystem. Neben physiologischen Barrieren, wie der Haut und der Magensäure sind auch bakterizid wirkende Substanzen, wie Lysozym, das in Körpersekreten wie Speichel und der Tränenflüssigkeit vorkommt und dort die Zellwand von Bakterien aufbricht, wichtige Komponenten der unspezifischen Abwehr. Gelingt es dennoch einem Krankheitserreger in den Organismus zu gelangen, können Fresszellen (Phagozyten) charakteristische Oberflächenstrukturen von Bakterien (Lipopolysaccharide) erkennen, diese an sich binden und phagozytieren. Eine weitere Komponente der unspezifischen Abwehr stellt das Komplementsystem dar. Bindung von Komponenten des Komplementsystems an fremde Oberflächenstrukturen setzt eine Reaktionskaskade in Gang, die schließlich zu einer Perforation der Fremdzellmembran führt. Allerdings kann das angeborene Immunsystem nur eine begrenzte Anzahl von Pathogenen erkennen und ist außerdem nicht in der Lage ein Gedächtnis auszubilden.

Anders als das angeborene Immunsystem hat das spezifische Immunsystem die Fähigkeit, seine Abwehrmechanismen an jeden denkbaren Krankheitserreger anzupassen, um diesen effektiv zu bekämpfen. Es wird daher auch als erworbenes oder adaptives Immunsystem bezeichnet. Die Fähigkeit des Immunsystems auf unterschiedlichste Antigene hochspezifisch reagieren zu können, lässt sich anhand der Theorie der klonalen Selektion nach Burnet erklären [23]. Diese besagt, dass zunächst eine Vielfalt von Lymphozyten mit unterschiedlichen Spezifitäten entsteht, anschließend aber nur die Zellen ausgewählt werden, welche die Fähigkeit besitzen ein Antigen spezifisch zu binden. Das adaptive Immunsystem wird grob in das zelluläre und das humorale Immunsystem eingeteilt. Die zelluläre Immunität wird durch T-Zellen vermittelt; den T-Helfer-Zellen, welche die Aktivität anderer Zellen des Immunsystems verstärken und regulieren, sowie den zytotoxischen T-Zellen, die unmittelbar an der Abwehr von Infektionen durch die Vernichtung der infizierten Zellen beteiligt sind. Die humorale Immunität basiert auf der spezifischen Aktivierung von B-Zellen, deren Differenzierung zu Plasmazellen und der Produktion von Antikörpern (Immunglobuline).

1.1.1 Antigene

Als Antigene bezeichnet man körperfremde Substanzen, die eine humorale oder zelluläre Immunantwort auslösen. Die unterschiedlichsten chemischen Verbindungen können Antigene darstellen. Die am besten untersuchten Antigene sind jedoch Proteine und Polysaccharide, die in löslicher Form oder als Teil komplexer Strukturen (z.B. Bakterienzellwand) stark immunogen wirken. Der Teil eines Antigens, der an einen Antigenrezeptor (B-Zellrezeptor oder T-Zellrezeptor) bindet, wird als Epitop bezeichnet, wobei ein Antigen in der Regel mehrere Epitope enthält. Die Größe eines Epitops lässt sich auf ca. 15 Aminosäuren abschätzen, der Anzahl von Kontaktamino-säuren bei einer Antigen-Antikörper-Bindung [15]. Jedoch tragen nur fünf dieser Aminosäuren, die sogenannten Schlüsselamino-säuren, stark zur Bindungsaffinität bei. Ein Austausch der Schlüsselamino-säuren würde zum kompletten Bindungsverlust führen, während die übrigen zehn Aminosäuren die Bindungsstärke nur schwach oder gar nicht beeinflussen [40]. Das Epitop kann in der Primärstruktur des Proteins aus einem Segment bestehen, was als lineares bzw. kontinuierliches Epitop bezeichnet wird. Hingegen setzt sich ein diskontinuierliches bzw. Konformationsepitop aus verschiedenen Abschnitten der Aminosäuresequenz zusammen, die durch Faltung in räumliche Nähe gebracht werden [12]. Die Erkennung diskontinuierlicher Epitope durch Antikörper setzt demnach eine native Antigen-Konformation voraus. Lediglich 10% aller Antikörper binden lineare Epitope [119].

1.1.2 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline) sind von Plasmazellen sezernierte Glykoproteine, die im Blut und anderen Körperflüssigkeiten zirkulieren und spezifisch an das Antigen binden, für das die entsprechende B-Zelle im Laufe ihrer Entwicklung selektiert wurde.

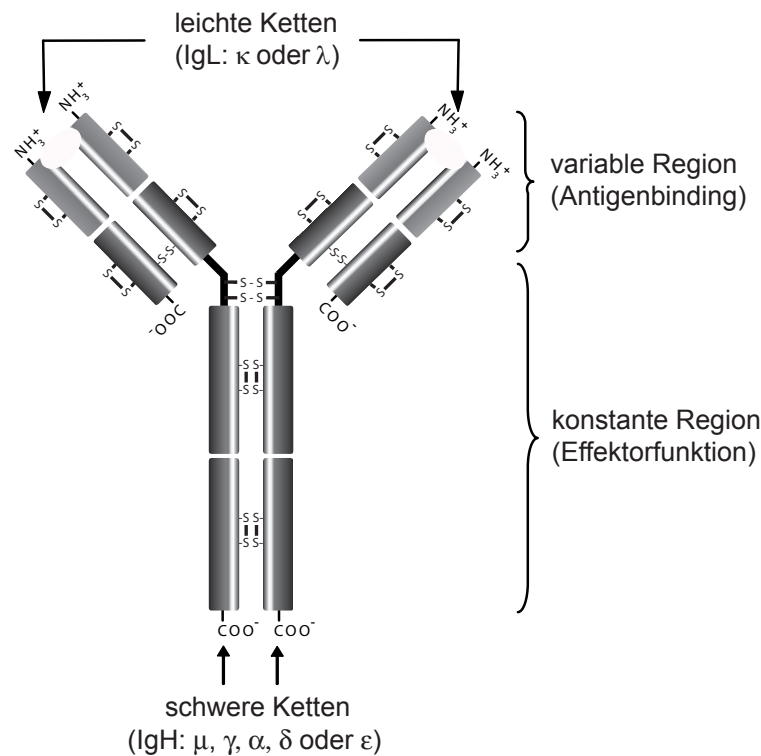


Abbildung 1.1: Antikörperstruktur. Die zwei schweren und leichten Ketten sind über Disulfidbrücken (S-S) miteinander verbunden. Die N-terminalen Enden der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten bilden zwei Antigen-Bindungsstellen aus. Der konstante Teil der schweren Ketten bestimmt die Antikörperklasse, die die Effektorfunktion des Immunglobulins definiert.

Die Grundstruktur aller Antikörpermoleküle setzt sich aus jeweils zwei leichten (light, IgL) und schweren (heavy, IgH) Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, zusammen (Abb. 1.1). Die schweren Immunglobulinketten lassen sich in fünf Haupttypen (μ , γ , α , δ , ϵ) unterteilen, die sich in ihrem Glykosylierungsmuster unterscheiden und die Klasse (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) des jeweiligen Antikörpers definieren. Die leichten Ketten kommen in zwei Haupttypen vor (κ , λ). Bei der Betrachtung der Antikörperstruktur im Hinblick auf die strukturelle Variabilität ergibt sich die Unterscheidung in variable (V) und konstante (C)-Region. Während in den N-terminalen Domänen der leichten und schweren Ketten die Sequenzvariabilität sehr groß ist (variable Region), sind die Aminosäuresequenzen der übrigen Domänen bei allen Antikörpermolekülen innerhalb einer Klasse sehr ähnlich und werden daher als konstante Regionen bezeichnet. Die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen zwei Antigen-Bindungsstellen aus. Die Kontaktregion des Antikörpers zum Antigen wird als Paratop bezeichnet.

Je nach Klassenzugehörigkeit können Antikörper durch spezifische Antigenbindung unterschiedliche Funktionen erfüllen.

1. Neutralisation des Pathogens. Erkennt ein Antikörper z.B. ein Toxin, kann dieser Antikörper die Wirkung des Toxins neutralisieren, indem er dessen Bindung an einen zellulären Rezeptor verhindert.
2. Opsonisierung des Pathogens. Durch Bindung eines Antikörpers an Mikroorganismen, werden diese für verschiedene Zelltypen (z.B. Makrophagen) erkennbar gemacht, die dann mittels Fc-Rezeptoren den konstanten Teil der Antikörper binden und das Pathogen phagozytieren.
3. Aktivierung des Komplementsystems. Eine Antikörperbindung an zelluläre Strukturen kann Komplement-vermittelt zytotoxisch wirken oder eine zelluläre Zytotoxizität induzieren.

Welche dieser Effektorfunktion ausgeübt wird, hängt von der Immunglobulinklasse des Antikörpers ab. So wirkt beispielsweise lösliches IgM, ein Pentamer aus fünf Antikörpereinheiten, sehr stark komplementaktivierend. Bei einer akuten Infektion wird es als erstes gebildet und kann daher zum Nachweis einer kürzlich erfolgten Infektion herangezogen werden.

1.1.3 Diversität des Antikörper-Repertoires

Das Immunsystem muss in der Lage sein, eine Vielzahl von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität zu bilden, um die Funktion der Antikörper, die Erkennung jedes möglichen Parasiten, zu gewährleisten. Entscheidend für die Diversität der Antikörper ist die variable Region (V). Die V-Region der schweren Kette wird durch drei verschiedene Gensegmente codiert, dem V-Gensegment (variable), dem D-Gensegment (diversity) und dem J-Gensegment (joining) die während der Reifung der Lymphozyten durch **somatische Rekombination** zu einem Gensegment zusammengelagert werden. Die so entstandene kombinatorische Vielfalt [152] lässt sich unter Einbeziehung sämtlicher funktioneller V-(D-)J-Kombinationen berechnen und ergibt etwa 3.3×10^6 rein keimbahnkodierte Möglichkeiten der Bildung funktioneller B-Zell-Rezeptoren und somit auch Antikörper [111].

Ein Mechanismus, der zur weiteren Diversifizierung des Antikörperrepertoires, zur sogenannten **junktionalen Vielfalt** führt, ist die Insertion und Deletion von Nukleotiden während der Verknüpfung der V-, (D-) und J-Segmente. Die durch diese Prozesse, die ohne Antigenkontakt ablaufen, entstandenen B-Lymphozyten bilden das sogenannte Prä-Immunrepertoire. Der Mensch besitzt etwa 10^9 bis 10^{10} verschiedene B-Lymphozyten [77].

Eine weitere Diversifizierung der variablen Genabschnitte der Immunglobuline, die **somatische Hypermutation**, beginnt mit Teilung des aktivierten B-Lymphozyten nach Antigenkontakt. Dieser Prozess findet in den Keimzentren der sekundär lymphatischen

Organe statt. Dabei werden in die rearrangierten Gene der variablen Regionen einer naiven B-Zelle in unterschiedlichem Umfang Punktmutationen eingefügt. Erhöht sich dadurch die Affinität des B-Zell-Rezeptors für das Antigen, werden diese B-Zellen selektiert. Dieser Prozess wird daher auch als Affinitätsreifung bezeichnet [112, 169]. Schließlich erhöht der Isotyp-Klassenwechsel zusätzlich den Grad der Diversität. Wie bereits beschrieben, üben unterschiedliche Antikörperklassen unterschiedliche Funktionen aus, die durch die Interaktion mit verschiedenen Ig Fc Rezeptoren [128] oder Komponenten des Komplementsystems [25] vermittelt werden.

1.1.4 Antikörpererkennung

Affinität und Avidität

Die Bindung des Antigens an den Antikörper erfolgt über nicht-kovalente Bindungen. Voraussetzung für eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung ist daher die räumliche Nähe und Komplementarität der Antigen- und Antikörper-Strukturen. Je besser sich Antigen und Antikörper in ihrer räumlichen Struktur entsprechen, desto mehr Bindungen können eingegangen werden und desto höher ist die Bindungsaffinität. Für ein System im Gleichgewicht ist die Bindungsaffinität durch die Bindungskonstante K definiert.

$$K = \frac{[AgAk]}{[Ag] \cdot [Ak]} \quad (1.1)$$

Die Stärke einer Antigen-Antikörper-Bindung wird außerdem von der sogenannten Avidität bestimmt. Die Avidität einer Antigen-Antikörper-Bindung hängt von der Valenz, also der Anzahl der Bindungen, die der Antikörper zum Antigen ausbildet, ab. Bildet ein Antikörper zehn Bindungen zu einem Antigen aus, ist die Wahrscheinlichkeit, dass alle Bindungen gleichzeitig dissoziieren außerordentlich gering [1]. Dieser kooperative Effekt erhöht die Bindungsstärke um ein Vielfaches, was vor allem in der frühen Phase der Immunantwort, wo noch keine Affinitätsreifung stattgefunden hat, von Bedeutung ist. Antikörper sind in der Regel bivalent (IgG, IgE, IgD), d.h. es stehen zwei Antigenbindungsstellen zur Verfügung. IgM Antikörper hingegen liegen meist in einer pentameren Struktur vor, d.h. sie verfügen über zehn Antigenbindungsstellen und somit über eine große Avidität.

Spezifität, Kreuzreaktivität und Polyspezifität

Antikörper, die im Zuge einer Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen gebildet wurden, können dieses mit hoher Affinität und hoher Spezifität binden. Diese grundsätzliche Eigenschaft des adaptiven Immunsystems beschreibt dieses jedoch nicht vollständig. Ebenfalls häufig beobachtete Phänomene sind Antikörper-Kreuzreaktivität, also die Fähigkeit eines Antikörpers außer an sein Epitop auch an Epitop-homologe Strukturen zu binden und Antikörper-Polyspezifität, welche durch die Bindung eines Antikörpers an Epitop-nicht-homologe Strukturen definiert werden kann [81, 84].

Der lange Zeit vorherrschenden Meinung, dass hochaffine Antikörper auch monospezifisch sind, d.h. nur ein Epitop erkennen, konnten im Zuge der Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen zahlreiche Studien entgegengesetzt werden, die monoklonale affinitätsgereifte Antikörper als polyspezifisch identifizieren konnten [2, 9, 42, 84, 120]. Was lange als unerwünschter Nebeneffekt der Antikörpererkennung galt, wurde inzwischen als ein wichtiges Merkmal des adaptiven Immunsystems, z.B. bei der Erkennung von Antigenvarianten [90], postuliert. So sind natürliche Antikörper, die typischerweise zur Klasse der IgM Antikörper gehören, in der Lage, viele verschiedenen Antigene mit geringer Affinität zu binden [10]. Sie spielen daher in der frühen Phase einer Infektion, in der noch keine Affinitätsreifung stattgefunden hat, eine wichtige Rolle [113].

Im Gegensatz dazu, wird Kreuzreaktivität von Antikörpern als ein auslösender Faktor bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis postuliert [115, 116]. Autoimmunkrankheiten sind die Folge einer Immunreaktion gegen körpereigene Zellen und Gewebe. Ein Antikörper, der gegen eine fremde Struktur gebildet wurde, kann auch körpereigene Antigene binden, wenn diese strukturell oder sequenziell dem Fremdan-tigen ähnlich sind, und so eine Autoimmunreaktion auslösen [48]. Eine Autoimmunkomponente wird z.B. bei der Entstehung von AIDS-Demenz-Komplex, einer HIV-assoziierten neurologischen Störung, vermutet, da in zahlreichen Studien anti-gp41 (HIV) Antikörper gefunden wurden, die auch Reaktivität gegen Proteine des Zentralnervensystems aufweisen [92, 98, 144, 166]. Normalerweise werden autoreaktive B-Lymphozyten, die Autoantikörper produzieren können, bereits während ihrer Entwicklung im Knochenmark eliminiert. So zeigen etwa 75% der durch Immunglobulin-Genrekombination entstandenen B-Lymphozyten Autoreaktivität, jedoch nur noch 20% der gereiften naiven B-Zellen [159]. Es gibt zahlreiche Beispiele, die die Kosten und Nutzen der Antikörperpolyspezifität darlegen, jedoch wurde das Ausmaß der Polyspezifität von Antikörpern bisher nur unzureichend untersucht.

Bisherige Studien untersuchten vor allem die strukturellen Voraussetzungen und Eigenschaften der Antikörper-Polyspezifität. Die geringere Spezifität von naiven Antikörpern wurde durch eine hohe Flexibilität ihrer Antigenbindungsregion begründet, während gezeigt werden konnte, dass affinitätsgereifte IgG-Antikörper wohldefinierte Bindungsregionen aufweisen, was die Bindung des Antigen nach dem *Schlüssel-Schloss-Prinzip* ermöglicht [161]. Im Gegensatz dazu konnte durch Röntgenstrukturanalyse am Beispiel des monoklonalen anti-p24 (HIV-1) Antikörpers CB4-1 in verschiedenen CB4-1-Peptid-Komplexen gezeigt werden, dass zwei sequenziell und strukturell unterschiedliche Peptide sowohl in derselben Antikörper-Paratopregion [84], als auch in unterschiedlichen Paratopregionen gebunden werden können [81], woraus man auch für affinitätsgereifte Antikörper auf eine gewisse Flexibilität der Bindungsregion schließen kann. Über die molekularen Voraussetzungen dieses Phänomens ist bislang wenig bekannt. Eine Studie, in der die intra- und intermolekularen Interaktionen in Antigen-Antikörper-Komplexen untersucht wurden, zeigte, dass spezifische Antikörper ihr Antigen vorzugsweise über elektrostatische Wechselwirkungen binden, während unspezifische Antikörper vorwiegend

über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Antigen interagieren [145].

Inwieweit ein Antikörper als kreuzreaktiv oder polyspezifisch beschrieben werden kann, wurde bisher nur unzureichend definiert. Als ein Maß für Kreuzreaktivität wurde die relative Bindungskonstante eines nativen und mutierten Epitops zu einem monoklonalen Antikörper postuliert [16]. Ein monoklonaler Antikörper bindet Antigen A mit der Affinität K_A und Antigen B mit der Affinität K_B . Ist die Affinitätsverhältnis groß ($K_A/K_B > 10^3$), kann der Antikörper als hochspezifisch für Antigen A angesehen werden. Ist dieses Verhältnis klein, ist der Antikörper unspezifisch, also kreuzreaktiv. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist dadurch eingeschränkt, dass alle möglichen Bindungspartner eines Antikörpers bekannt sein müssen und die Affinität des Antikörpers zu jedem seiner Antigene bestimmt werden muss, weshalb sie nur zur Untersuchung weniger Antikörper praktikabel ist.

Eine allgemeingültigere Methode zur Bestimmung eines Maßes für Antikörper-Polyspezifität basiert auf der Untersuchung von Antikörpern hinsichtlich ihrer Bindung an vier allgemeine Antigene, die eine Vielzahl von Antigenen repräsentieren sollen [149, 159]. Dazu zählen einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA, Lipopolysaccharid und Insulin. Bindet ein Antikörper an mehr als eines dieser Antigene wird dieser als polyreaktiv definiert. Dennoch ist die Methode durch die Verwendung von nur vier Antigenen eingeschränkt. Die Verwendung von Hochdurchsatzverfahren ermöglicht die Untersuchung der Antikörperbindung an weitaus mehr als vier Antigene und stellt daher eine äußerst vielversprechende Methode zur Untersuchung von Antikörper-Kreuzreaktivität und Polyspezifität dar.

1.2 Immunologische Testverfahren

Antikörper stellen wegen ihrer besonderen Struktur und der daraus resultierenden hohen Bindungsspezifität wichtige Werkzeuge in der medizinischen Diagnostik und Forschung dar. Besonders monoklonale Antikörper gewinnen seit der Einführung der Hybridomtechnik [82] mehr und mehr an Bedeutung. Sie dienen vor allem dem qualitativen und quantitativen Nachweis biologisch aktiver Substanzen, die z.B. bei Krankheiten als spezifische Biomarker gelten. Die sogenannte Immundiagnostik, die die spezifische Erkennung von Antigen durch Antikörper nutzt, dient der Identifikation von Giftstoffen, Krankheitserregern oder Proteinen, die eine bestimmte Krankheit charakterisieren. Solche Biomarker können durch spezifische Antikörper in Blut, Urin und Speichel aber auch in Serum und Plasma nachgewiesen werden. Andererseits können auch direkt krankheitsspezifische Antikörper nachgewiesen werden, insbesondere bei Allergien, Autoimmunkrankheiten und vielen Infektionskrankheiten werden solche Tests zur Diagnose herangezogen. Weitere Anwendungsgebiete der Immundiagnostik sind Schwangerschaftstests, der Nachweis illegaler Drogen und Dopingmittel, sowie die Überwachung von Arzneistoffen im Körper (Drug monitoring). [17, 21, 24, 148]

1.2.1 Hochdurchsatztechniken

Obwohl viele immundiagnostische Methoden bereits im klinischen Alltag verwendet werden [58, 103], beschränkt sich deren Anwendbarkeit auf vergleichsweise wenige Proben. Nur einzelne Antigen-Antikörper-Interaktionen können betrachtet werden. Eine schnelle, automatisierte und parallele Untersuchung spezifischer Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen ermöglichen Hochdurchsatztechniken, wie die bereits standardmäßig zum Hochdurchsatz-Screening eingesetzten Mikrotiterplatten, die je nach Format die parallele Untersuchung von wenigen hundert Proben ermöglicht [57, 110]. Mikroarrays stellen eine Miniaturisierung dieser Technik dar. Mikroarrays sind chemisch modifizierte Oberflächen, wie Glas- oder Siliziumobjektträger, auf denen viele verschiedene Substanzen, wie DNA, Proteine, Peptide oder Wirkstoffe ortsaufgelöst immobilisiert sein können. Da mehr Proben auf kleinerem Raum untergebracht werden können, ermöglichen Mikroarrays die parallele Untersuchung von mehreren 10000 Proben in einem Experiment [33, 93].

1.2.2 Protein-Mikroarrays

Ein großer Anteil der heutigen Protein-Mikroarrays geht aus der etablierten DNA-Mikroarray-Technik hervor. DNA-Mikroarrays, die eine robuste und gut charakterisierte Hochdurchsatztechnologie darstellen, werden bereits für eine Vielzahl von Fragestellungen, wie zur Analyse relativer Änderungen der Genexpression [35, 87, 91] oder zur Gendiagnostik [99] angewendet. Die Genexpressionsanalyse ermöglicht die Charakterisierung des gesamten Transkriptoms, also des gesamten RNA Gehaltes einer Zelle [50]. Da nahezu sämtliche Vorgänge in einer Zelle durch Proteine ausgeführt und reguliert werden, kann aufgrund des Genexpressionsmusters keine vollständige Aussage über die Vorgänge in einer Zelle getroffen werden. Transkriptom und Proteom, also der gesamte Proteingehalt einer Zelle, sind nicht vergleichbar. Zum einen sind die Translationsraten variabel, so wird nicht jede RNA in ein Protein translatiert bzw. können mRNAs noch prozessiert werden [62]. Zum anderen setzt sich das Proteom nicht einfach aus Sequenzinformationen der Proteine zusammen, sondern beinhaltet auch Informationen über ihre Proteinmenge, über posttranslationale Modifikationen [146], ihre Lokalisation innerhalb der Zelle, ihre Aktivität, Wechselwirkungen und Regulation. So können allein durch die Untersuchung des mRNA-Transkripts Protein-Protein-Interaktionen nicht vorhergesagt werden.

Um ein vollständiges Bild über die komplexen Vorgänge in einer Zelle zu erhalten, bedarf es der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, was wiederum aufgrund der Komplexität des Proteoms nur durch Hochdurchsatztechniken, wie Protein-Mikroarrays, überhaupt in sinnvollem Maßstab zu bewältigen ist. Die Umstellung auf die Proteinanalytik im Hochdurchsatzverfahren stellt eine große technologische Herausforderung dar. Die Schwierigkeiten bei der Herstellung von Protein-Mikroarrays liegen vor allem in der enormen physikalisch-chemischen Variabilität der Proteine und deren relativ niedrigen Stabilität begründet. Proteine können leicht bei Markierung oder Immobilisierung denaturiert werden und verlieren dabei ihre biochemische Aktivität. Des Weiteren ist es oft schwierig geeignete Immobilisierungs- und Detektionsstrategien für die heterogene Gruppe der Proteine zu definieren. Nicht zuletzt ist die Technologie sehr kostspielig und

aufwendig, da es keine einfache Methode wie PCR, zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, gibt, um Proteine zu reproduzieren.

1.2.3 Peptid-Mikroarrays

Gegenüber Proteinen bieten Peptide viele Vorteile. Sie sind zum einen stabil und daher leicht handhabbar. Die Funktionalität von Peptiden hängt zudem nicht von ihrem Faltungszustand ab. Sie sind außerdem einfach und kostengünstig zu synthetisieren und können gegebenenfalls chemisch modifiziert werden.

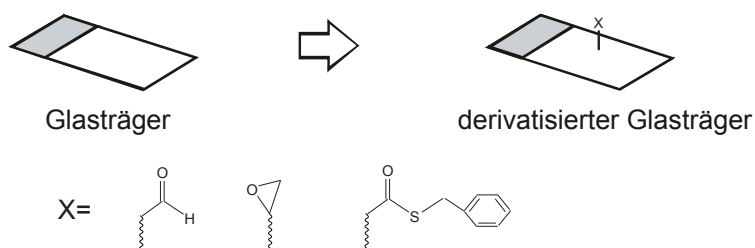
Herstellung von Peptid-Mikroarrays

Die Herstellung von Peptid-Mikroarrays (Abb. 1.2) setzt die Immobilisierung über eine kovalente Bindung, vorzugsweise über eine chemoselektive Reaktion voraus, während Makromoleküle wie DNA und Proteine durch physikalische Adsorption an der Oberfläche eines Trägers fixiert werden können. Eine kovalente Immobilisierung verlangt die chemische Modifizierung der Trägeroberfläche, um funktionelle Gruppen für die chemoselektive Anbindung der Probe zu erschaffen. Mittlerweile werden Objektträger aus Glas oder Plastik speziell für Mikroarrays mit unterschiedlichsten chemischen Modifizierungen der Oberfläche kommerziell hergestellt. Zum Beispiel reagieren primäre Amine mit Aldehyd-derivatisierten Glasträgern unter Ausbildung einer Schiffschen Base [95]. Diese und weitere chemoselektive Reaktionen werden bei der Immobilisierung von Peptiden angewendet [89, 167]. Im eigentlichen Immobilisierungsprozess wird die zu spottende Peptidlösung auf die Trägeroberfläche übertragen. Dabei kann das sogenannte Kontaktdruckverfahren, bei dem ein kleines, exaktes Volumen (von 0.5 bis 10 nl) der Peptidlösung über dünne Nadeln mittels eines Roboters auf die Oberfläche übertragen wird, bzw. das Nicht-Kontaktdruckverfahren [65, 114], bei dem die Peptidlösung über einen piezoelektrischen Impuls auf die Oberfläche übertragen wird, angewendet werden. Für beide Verfahren ist die Verwendung geeigneter Puffersysteme von enormer Wichtigkeit, denn sie beeinflussen zusätzlich zu möglichen Kontaminationen der Nadeln die Form und Gleichmäßigkeit der Spots entscheidend, was in einem ungünstigen Fall die Reproduzierbarkeit eines Mikroarray-Experiments stark beeinträchtigen kann.

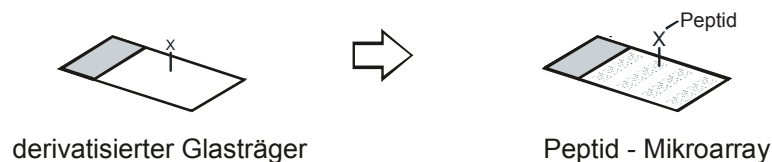
Detektionsverfahren

Es gibt zahlreiche Detektionsverfahren, die grob in zwei Hauptgruppen, die markierungs-basierten und markierungsfreien Detektionen [49, 63, 168], eingeteilt werden können. Unter den markierungsbasierten Verfahren werden am häufigsten Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt [118, 155]. Die Detektion kann durch die direkte Proteinmarkierung, Markierung der Proteine mit z.B. Biotin, das dann mit fluoreszenzmarkierten Detektormolekülen z.B. Streptavidin detektiert wird und über mehrstufige Detektionsverfahren (z.B. sekundäre Antikörper) erfolgen [49, 64, 110]. Die Fluoreszenzsignalintensität der an die Peptide gebundenen Proteine wird dann mit einem Laserscanner gemessen. Die markierungsfreien Detektionsverfahren bieten den entscheidenden Vorteil, dass sie ohne Detektormolekül, das zur Denaturierung von Proteinen oder einer möglichen Blockierung

A Oberflächenfunktionalisierung



B Peptidimmobilisierung



C Analytinkubation und Detektion

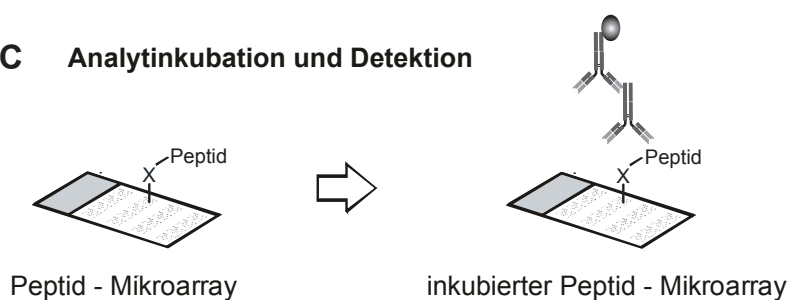


Abbildung 1.2: Herstellung von Peptid-Mikroarrays. **A:** Die Oberfläche handelsüblicher Objektträger wird chemisch so modifiziert, dass funktionelle Gruppen für die chemoselektive Anbindung der Peptide entstehen. Diese können u.a. Aldehyd- [95], Epoxy- [167] oder Thioester-Gruppen [89] sein. **B:** Peptide werden durch ein Druckverfahren (z.B. Kontakt- oder Nicht-Kontaktdruckverfahren) auf der Glasträgeroberfläche orts aufgelöst immobilisiert. **C:** Nach Inkubation einer biologischen Probe erfolgt die Bindungsdetektion. Hier ist die Detektion über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper dargestellt.

des Epitops führen kann, funktionieren. Eines der erfolgversprechendsten Verfahren zur markierungsfreien Bindungsdetektion ist die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), bei der eine Analytbindung auf der Mikroarrayoberfläche, eine messbare Veränderungen des Lichtreflexionswinkels bewirkt [74, 132, 137]. Die Nachteile von markierungsfreien Detektionsverfahren, wie Aufwendigkeit, teure Gerätschaften, ungenügende Sensitivität etc. begrenzen deren Anwendbarkeit im klinischen Alltag.

1.2.4 Technologische Variabilität

Dass es für Peptid-Mikroarrays kein einheitliches Herstellungs- und Detektionsverfahren gibt, verdeutlicht, wie vielfältig die Technologie ist und welcher außerordentlich großen Variabilität sie unterliegt. Quellen der Variabilität können systematisch sein, d.h. sie wirken sich auf viele Messpunkte aus. Dazu gehört beispielsweise die Effizienz des Peptid-druckprozesses oder der Inkubation der biologischen Probe. Systematische Fehler können durch Normierung korrigiert werden. Stochastische Fehler hingegen sind Einzeleffekte und resultieren z.B. aus unregelmäßiger Größe und Form der Peptidspots und aus Kontamination oder Degredation der Probe. Diese Effekte können durch Normierung nicht korrigiert werden.

Die Qualität von Mikroarraymessungen hängt demnach von vielen Faktoren ab, jedoch gibt es bisher nur wenige Studien, die die Verlässlichkeit von Mikroarraymessungen untersuchen [7, 75, 78], wie z.B. die Vor- und Nachteile verschiedener Glaträgertypen, Immobilisierungs- oder Detektionsverfahren. Es gibt überhaupt nur eine Veröffentlichung, in der ein Weg qualitativ hochwertige Daten für die statistische Datenanalyse zu extrahieren, beschrieben wird [107].

1.2.5 Verwendung von Mikroarrays

Ein Hauptanwendungsgebiet von Peptid-Mikroarrays ist die Untersuchung von Substratspezifitäten von Enzymen. Eine wichtige Enzymklasse stellen die Kinasen, die die posttranslationale Phosphorylierung von Proteinen katalysieren, dar. *Schutkowski et al.* [139] verwendeten Mikroarrays mit bis zu 6912 Peptiden, welche zum Teil von Abschnitten aus humanen Phosphorylierungsstellen abgeleitet waren. Diese Peptidbibliothek wurde mit drei Kinasen (PKA, PDK1, CK2) nach Phosphorylierungsmotiven durchsucht. Darüber hinaus wurden Cystein- [59] und Serin-Proteasen [60], die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren, mittels Peptid-Mikroarrays untersucht. Die Erforschung von Phosphatase-Aktivitäten [83] erforderte einen veränderten Versuchsaufbau. Da Phosphatasen die Dephosphorylierung von Peptiden katalysieren, wurden phosphorylierte Peptide auf Mikroarrays immobilisiert und mit Protein Tyrosin Phosphatase (PTP) inkubiert. Die Phosphatase-Aktivität wurde durch einen anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert und äußerte sich in einer Signalreduktion.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet für Peptid-Mikroarrays ist die Identifizierung von B-Zell-Epitopen. Beim sogenannten *Epitop Mapping* wird die Sequenz eines Antigenproteins in kleine überlappende Peptidsequenzen zerlegt, diese Peptide auf Mikroarrays

immobilisiert und das Bindungsvermögen von Antigen-spezifischen Antikörpern getestet. *Andresen et al.* [5] verwendete eine Bibliothek bestehend aus 251 Peptiden, die vom humanen Tyrotropinrezeptor (hTSHR) abgeleitet wurden, um die Epitope von sieben anti-hTSHR Antikörpern zu lokalisieren. In einer anderen Studie wurden die Bindungsmotive von humanem Chromogranin A (CgA) zweier monoklonaler anti-CgA Antikörper untersucht [29, 34].

Als Hochdurchsatzmethode bietet das Mikroarrayformat auch die Möglichkeit die Spezifität und Kreuzreaktivität von Antikörpern zu untersuchen [122]. *Predki et al.* verwendeten rund 5000 auf Mikroarrays immobilisierte Hefeproteine, um die Kreuzreaktivität von 11 poly- und monoklonalen Antikörpern, die gegen verschiedene Hefeproteine gerichtet sind, zu untersuchen [101]. Die Antikörper zeigten in unterschiedlichem Ausmaß Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen als ihren natürlichen Antigenen. Diese Art der Anwendung könnte für die Entwicklung spezifischer therapeutischer Antikörper eines Tages von großer Bedeutung sein, allerdings ist aufgrund der Komplexität des humanen Proteoms die Identifizierung von Antikörper-Kreuzreaktivität im humanen System heute nur begrenzt möglich.

Ein zentrales Anwendungsgebiet von Peptid- und Protein-Mikroarrays ist die serologische Diagnostik. Dieses Verfahren beinhaltet die qualitative Erfassung und Quantifizierung einer Antigen-Antikörper-Reaktion. So wurden Peptid-Mikroarrays zur serologischen Detektion von Hepatitis B und C Viren, HIV, Epstein-Barr Viren und Syphilis verwendet [41]. Ein Mikroarray, der sich aus den bekanntesten Allergenen zusammensetzt, wurde zur Erstellung von IgE-Reaktivitätsprofilen von Allergieklienten benutzt [11, 67].

Vor allem hinsichtlich der gezielten Suche nach Biomarkern, die eine Krankheit charakterisieren oder auch prognostizieren können, wurden viele Anstrengungen unternommen. So konnten mit Hilfe von Protein-Mikroarrays Biomarker für Brustkrebs [165] und Prostatakrebs [102] identifiziert werden. *Chatterjee et al.* gelang die Differenzierung von Patienten mit Eierstockkrebs von denen mit anderen Krebsarten und gesunden Personen [28].

Im Fokus der serologischen Diagnostik mit Mikroarrays stehen vor allem auch Autoimmunkrankheiten, da diese meist nicht durch einzelne Antigene charakterisierbar sind. Mittels Autoantigen-Mikroarrays konnten Autoantikörper in Patientenseren quantifiziert und so verschiedene Autoimmunkrankheiten unterschieden werden [79, 133]. *Quintana et al.* differenzierte anhand Autoantigen-basierter Mikroarrays verschiedene Multiple Sklerose-Typen [125].

Aber auch Krankheiten, die nicht auf einer humoralen Immunantwort basieren, könnten mit Mikroarraystudien diagnostiziert werden, nämlich dann, wenn der Zytokingehalt einer biologischen Probe bestimmt wird, was auch zum Verständnis immunologischer Mechanismen beitragen kann. *Schweitzer et al.* verwendeten Antikörper-Mikroarrays, um 75 verschiedene humane Zytokine simultan zu quantifizieren [141].

1.3 Zufallspeptidbibliotheken und Antikörperbindungsstudien

Die in Abschnitt 1.2.5 beschriebenen Methoden basieren ausschließlich auf der Detektion spezifischer Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, d.h. die dazu verwendeten Proben sind an die untersuchte Fragestellung angepasst. So wurden beispielsweise spezifische Antigene oder synthetische Peptide, die sich von Antigenen ableiten auf Mikroarrays immobilisiert.

Jedoch sind für viele Krankheiten spezifische Antigenmarker unbekannt. Eine Möglichkeit dieser Diskrepanz zu begegnen, ist die Verwendung von Peptidbibliotheken, die unabhängig von der zu untersuchenden Fragestellung sind. Peptidbibliotheken, die rein zufällig zusammengesetzt sind, verfügen, neben der Tatsache, dass sie unvoreingenommene Untersuchungen erlauben, über weitere Vorteile. Sie besitzen eine größere Sequenzdiversität als Antigenbibliotheken, und decken daher ein breiteres Spektrum möglicher Bindungspartner ab. Sie sind universell einsetzbar, d.h. für verschiedene Fragestellungen müssen keine verschiedenen Peptidbibliotheken synthetisiert werden, was Zeit und Kosten spart.

Dass Zufallspeptide für Antikörperbindungsstudien geeignet sind, wurde auch schon mit einigen Studien belegt [20, 27]. *Reineke et al.* untersuchten das Bindungsverhalten monoklonaler Antikörper gegenüber einer Bibliothek aus 5520 synthetischen Zufallspeptiden [129] und konnten so neue Epitope identifizieren. In einer anderen Arbeit von *Dybwad et al.* konnte gezeigt werden, dass auf der Oberfläche von Phagen präsentierte Zufallspeptide geeignet sind, um spezifische Liganden für Serumantikörper von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu identifizieren [43].

1.4 Charakterisierung ausgewählter Krankheiten

1.4.1 Nematoden und Infektionen mit *H. polygyrus*

Nematoden sind Fadenwürmer, die sowohl in Pflanzen als auch in Tieren leben. Die Infektion der Wirte mit parasitären Nematoden erfolgt über die Einnahme von mit Larven oder Eiern verunreinigten Lebensmitteln. Im Allgemeinen induzieren diese Parasiten eine starke Th2-Immunantwort. Eine Infektion ist durch eine starke IL-4 Produktion [104] sowie durch einen hohen IgG1 Titer [14] charakterisiert. Der Fadenwurm *Heligmosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*), der den Zwölffingerdarm u.a. von Mäusen bevölkert, dient als Modellorganismus zur Untersuchung von humanen Darmwürmern und der von ihnen hervorgerufenen Infektionen [96].

1.4.2 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunkrankheit, die mehrere Bereiche des Körpers, wie die Haut, die Gelenke oder verschiedene Organe beeinträchtigen kann. Diese Krankheit ist durch die Ausbildung autoreaktiver T-Zellen, sowie hochaffiner IgG Autoantikörper gekennzeichnet, die in verschiedenen Organen, u.a. den Nieren,

Entzündungsreaktionen verursachen [142]. Die Diagnose von SLE ist aufgrund der Uniformität der Symptome mit anderen Autoimmunkrankheiten und fehlender spezifischer Autoantigenmarker problematisch [39].

Die Untersuchung dieser Autoimmunkrankheit erfolgt u.a. mithilfe von Mausmodellen. Bei der Fc γ -Rezeptor-IIB *knockout*-Maus handelt es sich um ein Mausmodell, das zur Beschreibung von SLE herangezogen werden kann [18]. Die verminderte oder fehlende Expression von Fc γ RIIB auf B-Zellen, dem einzigen bekannten IgG-inhibierenden Fc γ -Rezeptor [126, 157], bewirkt die vermehrte Ausbildung von IgG-Autoantikörpern. C57BL/6 Mäuse, bei denen die Fc γ RIIB Expression deaktiviert wurde (Fc γ RIIB^{-/-}.B6), zeigen eine vermehrte Bildung von anti-DNA und anti-nukleären IgG2b und IgG2c-Autoantikörpern [19, 45, 46].

1.4.3 Humanes Astrozytom

Astrozytome gehören zu den häufigsten Formen von Hirntumoren. Sie leiten sich von den Astrozyten ab, die zum Stützgewebe des Zentralnervensystems, den Gliazellen, gehören. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet vier Malignitätsgrade (I-IV), wobei Astrozytome Grad II (A-II) und Grad IV (A-IV) bei Erwachsenen am häufigsten diagnostiziert werden (Abb. 1.3).

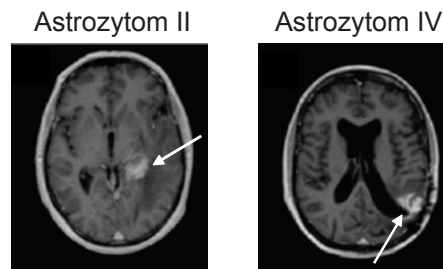


Abbildung 1.3: MRT Beispielbilder von Astrozytom II (A-II) und Astrozytom IV (A-IV) Tumoren (entnommen aus Pöpperl *et al.* [121]). Bei den kontrastverstärkten Regionen (gezeigt mit Pfeilen) handelt es sich um Tumorgewebe. Die Bestimmung des Tumorgrades ist durch bildgebende Verfahren nicht möglich.

Ein frühzeitiger Nachweis des Tumorgrades ist entscheidend für die weitere Behandlung und Prognose des Patienten. Die Bestimmung des Malignitätsgrades ist durch bildgebende Verfahren nicht möglich, sondern erfordert eine histologische Analyse von Tumorgewebe, das durch eine Biopsie entnommen werden muss.

Ziel ist es, derart hochinvasive Verfahren, die mit hohem Risiko für den Patienten verbunden sind, durch minimalinvasive Methoden zur Diagnose des Tumorgrades zu ersetzen. Dass sowohl eine humorale Immunantwort auf Gliome im Mausmodell [105], als auch bei humanen Intrakranialtumoren [30] beobachtet werden konnte, unterstützt die Hypothese, dass sich das Antikörperrepertoire aufgrund eines Hirntumors nachweislich

verändert und somit zur serologischen Diagnose des Tumorgrades herangezogen werden kann.

1.5 Diagnostik mit Peptid-Mikroarrays

Das Antikörperrepertoire eines jeden Individuums ist einzigartig und von dessen gegenwärtigem Immunzustand abhängig. Individuen mit ähnlichen Immunzuständen (z.B. dieselbe Krankheit) sollten Gemeinsamkeiten im Antikörperrepertoire haben. Individuen, die über verschiedenen Antikörperrepertoires verfügen, sollten sich auch in ihrem Serumantikörperbindungsprofil unterscheiden. Auf dieser Annahme beruht die Überlegung, das Antikörperbindungsprofil als charakteristischen Marker für einen Immunzustand, bzw. die Mikroarraytechnologie als diagnostisches Instrument zur Unterscheidung von gesunden und kranken Individuen einzusetzen [22].

Wie unterschiedlich sind jedoch die Antikörperbindungsprofile gegenüber Zufallspeptiden? Bei dieser Art der Anwendung werden keine einzelnen Antigen-Antikörper-Interaktionen gemessen, die eine Krankheit charakterisieren könnten, sondern das gesamte Antikörperrepertoire wird betrachtet. Die Mikroarraybilder in Abb. 1.4-A zeigen die IgM- und IgG-Antikörperbindungsprofile von einer gesunden BALB/c Maus im Vergleich zu denen von *H.polygyrus*-infizierten Mäusen, 10, 14 und 18 Tage nach der Infektion [22]. Auf den ersten Blick sind kaum Unterschiede im Bindungsmuster zu erkennen. Betrachtet man allerdings das gesamte Bindungsmuster genauer, treten Unterschiede zwischen den Gruppen zutage. So vergrößert sich die Varianz der Bindungssignale (Abb. 1.4-B) mit zunehmender Krankheit, was durch ein diverseres Antikörperrepertoire in einem späteren Stadium der Infektion hervorgerufen wird [22].

Die Unterschiede zwischen den Antikörperbindungsprofilen verschiedener Individuen sind sehr vielschichtig und erfordern daher auch eine komplexe statistische Datenanalyse. Ein Weg der statistischen Datenanalyse, der in der Dissertation von Nicole Bruni herausgearbeitet wurde, ist in Abb. 1.5 gezeigt.

Die Signalintensitäten werden in einer Datenmatrix bestehend aus n Peptiden und m Seren angeordnet. Da in solch einem multidimensionalen ($n \times m$) Datenraum der Zusammenhang zwischen der gemessenen Signalintensität und dem Krankheitszustand eines Individuums kaum zu determinieren ist, wird die Hauptkomponentenanalyse (PCA) [76] angewendet, um hochdimensionale in niedrigdimensionale Datensätze zu überführen. Durch PCA werden die größten Varianzen innerhalb der Daten identifiziert und in einem zweidimensionalen Raum derart abgebildet, dass die größte Varianz (erste Hauptkomponente) auf die erste Koordinate und die zweitgrößte Varianz (zweite Hauptkomponente) auf die zweiten Koordinate eines zweidimensionalen Koordinatensystems projiziert wird. Die PCA ist eine nichtparametrische Analysemethode und erlaubt eine völlig unvoreingenommene Identifizierung von Trends in Datensätzen. Oftmals ermöglicht sie bereits eine Klassifizierung von Datensätzen nur aufgrund ihrer höchsten Varianzen und somit eine Diagnose des Krankheitsstatus eines Individuums.

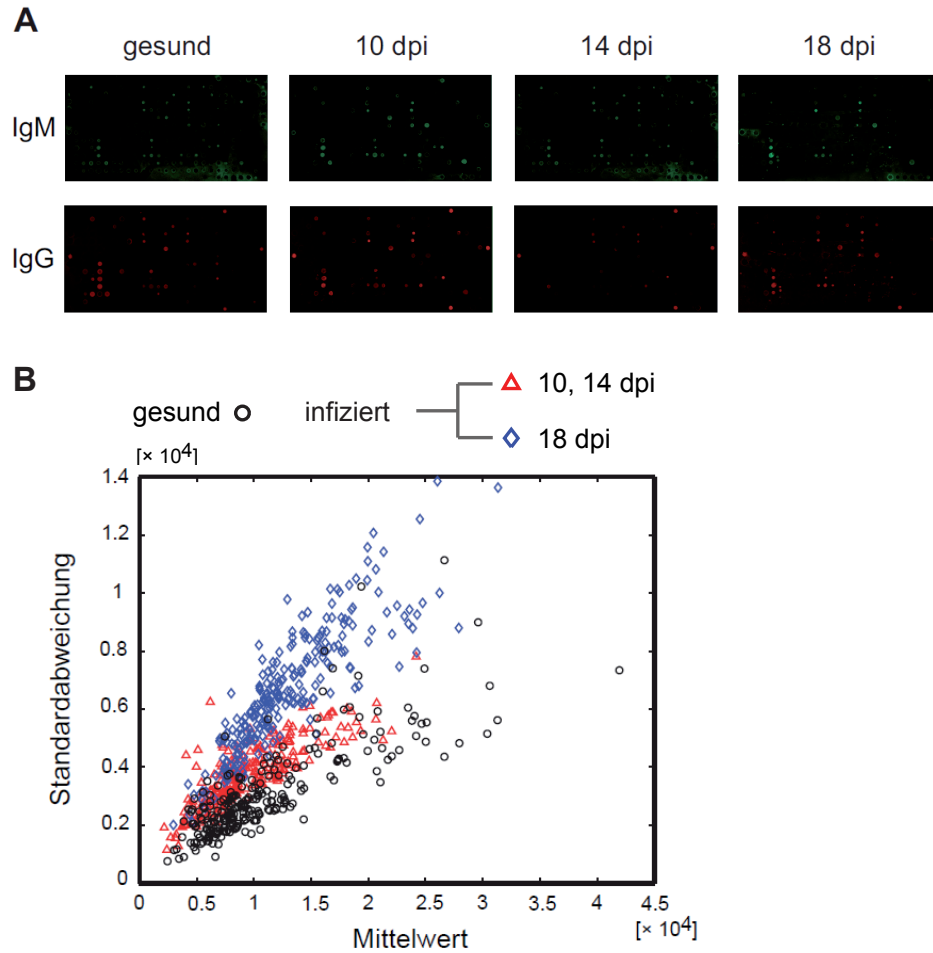


Abbildung 1.4: Serumantikörperbindungsprofile von gesunden und *H.polygyrus* infizierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion. Serum von gesunden und *H.polygyrus* infizierten Mäusen 10, 14 und 18 dpi wurde auf Peptid-Mikroarrays inkubiert und die IgG- und IgM-Bindungssignale durch fluorochrommarkierte, isotypspezifische Sekundärantikörper detektiert [22]. **A:** Repräsentative Mikroarraybilder der IgG- und IgM-Antikörperbindungsmuster aus jeder Gruppe sind gezeigt. **B:** Mittelwert und Standardabweichung der Signalintensitäten der IgM-Antikörper-Bindungssignale für jedes einzelne Peptid über alle Serumproben der jeweiligen Gruppe (gesund, infiziert (10, 14 dpi), infiziert (18 dpi)). Entnommen aus der Dissertation von Nicole Bruni [22], mit freundlicher Genehmigung.

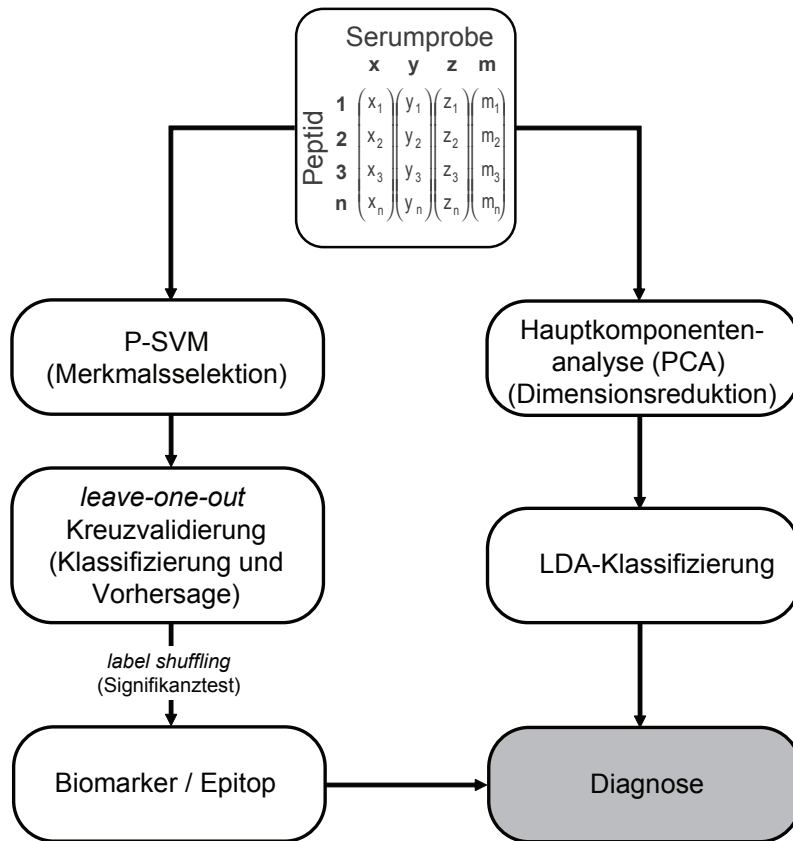


Abbildung 1.5: Analyseweg zur Unterscheidung von Antikörperbindungsprofilen. Die Signalintensitäten werden in einer Datenmatrix bestehend aus n Peptiden und m Seren angeordnet. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) dient der Dimensionsreduktion und kann zu einer Klassifizierung von Datensätzen aufgrund ihrer größten Varianzen und somit zur Diagnose des Krankheitsstatus eines Individuums führen. Bei Datensätzen, die nicht aufgrund ihrer größten Varianz eindeutig klassifizierbar sind, werden durch Merkmalsselektion (P-SVM), zur Klassifizierung und Vorhersage eines Immunzustandes, geeignete Merkmale (Biomarker) selektiert. Die Signifikanz der selektierten Biomarker, die der Diagnose des Krankheitsstatus eines Individuums dienen, wird bestimmt.

Datensätze, die nicht aufgrund ihrer größten Varianz eindeutig klassifizierbar sind, erfordern die Anwendung voreingenommener Analysemethoden, wie z.B. den Algorithmus der *Potential Support Vector Machine* (P-SVM) [69, 70]. P-SVM selektiert, durch überwachtes Lernen, Merkmale aus einem Datensatz, die für die Klassifizierung von Gruppen des Datensatzes geeignet sind (Merkmalsselektion). Bei diesen Merkmalen handelt es sich um Peptide, die aufgrund ihrer Bindungseigenschaften, zwischen gesunden und kranken Individuen zu unterscheiden vermögen und daher als Biomarker für die Diagnose einer bestimmten Krankheit dienen können.

Zur Diagnose eines Immunzustandes muss die Gruppenzugehörigkeit einer Probe vorhergesagt werden. Die Genauigkeit der Vorhersage wird so bestimmt, dass aus dem untersuchten Datensatz ein Datenpunkt herausgenommen wird, mit den verbliebenen Datenpunkten die klassifizierenden Peptide selektiert werden und mit diesen dann der herausgenommene Datenpunkt vorhergesagt wird (*leave-one-out* Kreuzvalidierung). Diese Prozedur wird für alle Datenpunkte wiederholt. Die Vorhersagegenauigkeit bzw. die diagnostische Zuverlässigkeit (DZ) berechnet sich dann aus dem Anteil an richtig und falsch vorhergesagten Datenpunkten.

Die Signifikanz der Merkmalsselektion, sowie der *leave-one-out* Kreuzvalidierung wird durch Durchmischung der Gruppenlabels (*label shuffling*) ermittelt. Dabei werden die Gruppenlabels der Seren (gesund, krank, usw.) zufällig durchmischt und die Gruppen mit derselben Anzahl von Peptiden, die bei den Originallabels verwendet wurde, durch Merkmalsselektion klassifiziert bzw. durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung vorhergesagt. Dieser Vorgang wird 1000 Mal wiederholt. Die Signifikanz der Klassifizierung (Vorhersage) errechnet sich dann aus dem Anteil aus 1000 Versuchen, bei dem mit den durchgemischten Labels eine genauso gute oder höhere Klassifizierungsgenauigkeit (diagnostische Zuverlässigkeit) erhalten wurde, wie mit den Originallabels.

Dieser statistische Analyseweg wird auf verschiedene Datensätze zur Diagnose von Infektionskrankheiten (Abschnitt 5.1), von Autoimmunkrankheiten (Abschnitt 5.2) und von Krebs (Abschnitt 5.3) angewendet.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen Bewertungskriterien für die Qualität von Antikörper-Peptid-Bindungsstudien unter Verwendung der Peptid-Mikroarray-Technologie herausgearbeitet werden, mit dem Ziel, diese Hochdurchsatzmethode für qualitative und quantitative Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen zu optimieren. Folgende Aspekte sollen dabei betrachtet werden:

- **Technologische Einflussfaktoren:** Anhand der Messung bekannter Antikörper-Peptid-Interaktionen soll der Einfluss technologischer und experimenteller Kon-ditionen auf die Reproduzierbarkeit von Mikroarray-Bindungsstudien untersucht werden.
- **Bestimmung der Affinität von Antikörper- Peptid- Interaktionen mit-tels Mikroarray-Bindungsstudien:** Kann die gemessene Signalintensität die Bindungsdissoziationskonstante von Antikörper-Peptid-Komplexen wiedergeben?
- **Messung von Serumantikörperbindungssignalen auf Zufallspeptidbiblio-theken:** Die technologischen Einflussfaktoren auf die gemessenen Signalintensitäten sollen ermittelt, bewertet und ein experimentelles Protokoll herausgearbeitet werden, das die Gewinnung qualitativ hochwertiger Bindungsdaten ermöglicht. Außerdem sollen die Eigenschaften der gemessenen Signalintensitäten von Serumantikörper-bindungsmessungen analysiert werden.
- **Messung der Antikörperbindungssignale auf Zufallspeptidbibliotheken:** Die Verwendung von Zufallspeptiden soll als Methode, die kein *a priori* Wissen vor-aussetzt, etabliert und zur Bestimmung der Polyspezifität monoklonaler Antikörper verwendet werden.
- **Analyse von Serumantikörperbindungsprofilen anhand ver-schiedener statistischer Methoden:** Der statistische Analyseweg [22] soll an-hand verschiedener Testdatensätze validiert und experimentelle Einflussfaktoren im Hinblick auf die Etablierung einer serologischen Diagnosemethode untersucht werden.
- **Entwicklung einer minimal-invasiven serologischen Diagnostik von pri-mären Astrozytomen:** Die verwendeten Methoden sollen erstmals hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zur Diagnose einer Krankheit im humanen System überprüft und gezeigt werden, dass kein *a priori* Wissen über Antigene erforderlich ist, um Krankheitsmarker zu bestimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen.

Geräte und Chemikalien	Beschreibung
pH Meter	pH-Meter CG 840, Schott
Zentrifuge	Centrifuge 5403, Eppendorf
Schüttler	Wipptisch, Fröbel Labortechnik GmbH
Hybridisierungsstation	HS4800 Hybridisierungsstation, Tecan
Mikroarray Scanner	Genepix 4200AL, Molecular Devices GmbH
Photometer	Ultrospec 3000, UV/Vis Spektrometer, Amersham Pharmacia Biotech
ELISA Reader	FLUOstar Optima, BMG Labtech
PCR Gerät	Mastercycler ep gradient, Eppendorf

3.2 Mikroarrays

Chargen Nummer	Beschreibung
525, 549	Glasträger: Genetix, Greiner, Corning, Eri Scientific; Peptiddruck: JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin; CB4-1 Peptidbibliothek
840, 901	Glasträger: Corning; Peptiddruck: JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin; Zufallspeptidbibliothek P_{14+}^{300}
1186, 1188, 1189, 1190	Glasträger: Corning; Peptiddruck: JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin; Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$

3.3 Antikörper und Sekundärantikörper

Antikörper	Beschreibung
CB4-1	anti-p24 (HIV-1), W. Höhne, AG Proteinstruktur, Biochemie, Charité
ED38, eiJB40, mGO53, PN16, PN89, PN138, PN115, VB1, VB4, VB142, VB161, VB176, VB18	humane Antikörper aus IgG ⁺ Gedächtnis-B-Zellen, H. Wardemann, MPI für Infektionsbiologie, Berlin
humanes Referenzserum	Bethyl Laboratories Inc.
Human IgG (kappa)	Sigma Aldrich
anti-Human-IgM	Bethyl Laboratories Inc.
anti-Human-IgM-HRP	Bethyl Laboratories Inc.
anti-Maus-IgG2c	Bethyl Laboratories Inc.
anti-Maus-IgG2b	Bethyl Laboratories Inc.

Antikörper	Beschreibung
anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 647	Invitrogen
anti-Maus-IgM-Alexa Fluor 546	Invitrogen
anti-Human-IgG-Alexa Fluor 647	Invitrogen
anti-Human-IgG-Alexa Fluor 546	Invitrogen
anti-Human-IgM-Alexa Fluor 647	Invitrogen
anti-Human-IgG1	Bethyl Laboratories Inc.

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Beschreibung
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	9.2 mM Na_2HPO_4 , 1.6 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.4
TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.5
T-PBS	PBS, 0.05% Tween 20
Blockierungspuffer (Mikroarray Inkubation)	PBS, 1% BSA
Blockierungspuffer (ELISA)	50 mM TBS, pH 8.0, 1% BSA, Sigma Aldrich
Beschichtungspuffer (Serum IgM ELISA)	0.05 M Carbonat-Bicarbonat Puffer, pH 9.6, Sigma Aldrich
Probenpuffer (Serum IgM ELISA)	50 mM TBS, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0
SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)	3 M NaCl, 0.3 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 7.0, Invitrogen

Puffer und Lösungen	Beschreibung
Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	BlueJuice™, Invitrogen
Marker (DNA-Gelelektrophorese)	100 bp DNA ladder, Invitrogen
Laufpuffer (TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer))	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.3
Ladepuffer (SDS-PAGE)	Novex™ Tris-Glycin SDS Probenpuffer, Invitrogen
Ladepuffer reduzierend (SDS-PAGE)	62 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 0.001% Bromphenolblau
Marker (SDS-PAGE)	SeeBlue™ Plus2 Pre-stained, Invitrogen
Färbelösung (SDS-PAGE)	PageBlue™ Protein Färbelösung, Fermentas
LB-Medium	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.4
DMEM Pur Medium	Roche
DMEM Nutridoma Medium	Roche

3.5 Kits

Anwendung	Kit-Beschreibung
Antikörper Konjugation	Alexa Fluor® 546 bzw. Alexa Fluor® 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit, Invitrogen
Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit, Quiagen
Human IgM ELISA	Human IgM ELISA Quantification Kit, Bethyl Laboratories Inc.

3.6 Seren

3.6.1 Seren von *H.polygyrus*-infizierten Mäusen

Seren von gesunden und mit *Heligmosomoides-polygyrus* (*H.polygyrus*)- infizierten BALB/c Mäusen wurden von S. Hartmann (Molekulare Parasitologie, HU Berlin) zur Verfügung gestellt. BALB/c-Mäuse wurden mit dem im Darm ansässigen Fadenwurm *Heligmosomoides-polygyrus* durch orale Inokulation mit 150 infektiösen *H.polygyrus*-Larven infiziert. Erfolgreiche Infektionen wurden durch fäkale Eierzählung und durch Rückgewinnung von adulten Würmern aus dem Dünndarm der Mäuse überprüft. Blut wurde von gesunden sowie von infizierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (10, 14, 18 dpi) abgenommen. Die Blutproben wurden bei RT zur Gerinnung stehen gelassen und anschließend bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

3.6.2 Seren von $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen

Seren von neun gesunden C57BL/6 Mäusen und 21 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen wurden von Marc Ehlers (AG Toleranz und Autoimmunität, DRFZ, Berlin) zur Verfügung gestellt [151]. Die Mäuse wurden unter keimfreien Bedingungen gehalten. $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen wurden im Alter von 18 Wochen (5 Proben) und 28 Wochen (16 Proben) Blut entnommen. Die Blutentnahme bei gesunden C57BL/6 Mäusen erfolgte im Alter von 12-28 Wochen. Die Blutproben wurden bei RT zur Gerinnung stehen gelassen und anschließend bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Der Nachweis der Autoimmunerkrankung erfolgte durch Bestimmung des IgG2b- und IgG2c-Autoantikörpertiters mittels ELISA. ELISA Messungen wurden von Maria Fischer (AG Toleranz und Autoimmunität, DRFZ, Berlin) durchgeführt.

3.6.3 Seren von Astrozytompatienten

Seren von 24 Astrozytom Grad III und Grad IV Patienten (hochgradige Astrozytome, *hA*) und 8 Astrozytom Grad I und Grad II Patienten (niedriggradige Astrozytome, *nA*) wurden von Christian Schichor (Ludwig Maximilians Universität, München) zur Verfügung gestellt (Tabelle 3.2). Der Tumorgad wurde bei allen Patienten durch eine histologische Analyse von Tumorgewebe bestätigt. Es handelt sich bei allen Proben um Seren von Patienten mit primären Tumoren, Tumor-Rezidive wurden im untersuchten Datensatz nicht berücksichtigt. Blut wurde vor oder während der operativen Resektion des Tumors abgenommen (Serumröhrchen; Sarstedt Nr.: 02.1063). Die Blutproben wurden 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend 5 min bei RT mit 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.2: Astrozytompatienten. Anzahl, Alter und Geschlecht der Astrozytompatienten, die in die Studie einbezogen wurden, sowie Informationen über die Tumorart und die Behandlung der Patienten mit Kortison, sind aufgelistet.

	hochgradiges Astrozytom (<i>hA</i>)	niedriggradiges Astrozytom (<i>nA</i>)
Anzahl der Patienten	24	8
Alter (Mittelwert)	25-83 (56)	21-59 (37)
Geschlecht m/w	16/8	2/6
Rezidiv ja/nein	0/24	0/8
Kortisonbehandlung ja/nein	18/6	3/5

3.7 Quantifizierung von Serum-IgM

Die Serum IgM Konzentrationen in Astrozytom-Patientenseren sowie in gesunden Spenderseren wurden durch Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) bestimmt. Für alle Tests wurde der Human IgM ELISA Kit (Bethyl Laboratories Inc.) verwendet. Costar 96-well Mikrotiterplatten wurden mit anti-human IgM (10 µg/ml in Beschichtungspuffer, 100 µl pro well) 1 h bei RT beschichtet. Nachdem die Platte dreimal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit Blockierungspuffer (TBS, 1% BSA) für 1 h bei RT, gefolgt von drei weiteren Waschschritten. Anschließend wurden 100 µl der Proben (1:300-1:1000 Verdünnung in Probenpuffer (PP)) und Standardlösungen (humanes Referenzserum 2 µg/ml, 1:2 Verdünnung in PP) auf die Mikrotiterplatte übertragen und 2 h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden 100 µl pro well des peroxydasemarkierten Sekundärantikörpers anti-human IgM-HRP (0.2 µg/ml in PP) auf die Platte gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen, 100 µl pro well Peroxydase-Substrat (1-step ABTS, Invitrogen) auf die Platte übertragen, 1-10 min inkubiert und die Absorption bei 405 nm gemessen.

3.8 Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper stammen von einzelnen B-Zellen ab, die aus peripherem Blut eines gesunden Spenders gewonnen wurden. Die Immunglobulin Gensegmente der schweren und leichten Kette der variablen Region wurden durch RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) amplifiziert, Enzymrestriktionsstellen wurden eingebaut und das PCR Produkt in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert, der die entsprechende konstante Region des Immunglobulins (IgG1) codiert. Die Plasmid DNA für zehn humane monoklonale Antikörper wurden in der Arbeitsgruppe von H. Wardemann (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) wie beschrieben [150] hergestellt und zur Verfügung gestellt. Von diesen zehn Sequenzen, handelt es sich um fünf original mutierte und fünf auf die Keimbahnsequenz revertierte Sequenzen. Die Sequenzen der CDR3 Region der schweren und leichten Ketten [149] sind in Tabelle 3.3 angegeben.

Tabelle 3.3: Sequenzdaten von IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen des gesunden Spenders PN [149].

ID	schwere Kette IgH		leichte Kette IgL	
	CDR3 (original)	CDR3 (revertiert)	CDR3 (original)	CDR3 (revertiert)
PN7	RVTGTTSDFDY	RVTGTTSDFDY	LLSYSGTRV	LLSYSGARV
PN46	RPYYYGSGTGWS	RPYYYGSGTGWS	QQYDNSPFT	QQYGSSPFT
PN56	AFDLWSGWPFAY	AFDFWSGWPFDY	QQYDSSPIT	QQYGSSPIT
PN60	GWGWLPD	GWGWLPDY	QQYAISPIT	QQYGSSPIT
PN67	DRERGYSGYGHLPD	DRERGYSGYGHLPD	ASWDDSLSGLYV	AAWDDSLSGLYV

3.8.1 Transformation

5 μ l kompetente Bakterien (E.coli) wurden mit 1 μ l Plasmid DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s 42°C ausgesetzt, 100 μ l LB Medium wurde zugesetzt und 25 min unter moderatem Schütteln inkubiert. Der Transformationsmix wurde auf ampizillinhaltigen (100 μ g/ml) LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden dann in ampizillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C vermehrt und Plasmide anschließend präpariert.

3.8.2 Insert-Überprüfung

Die ausgewählten Bakterienkolonien wurden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) auf die Präsenz des korrekten Inserts hin überprüft. Hierbei wurden zwei geeignete Oligonukleotidprimer [150], thermostabile Taq DNA Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Bausteine in einem geeigneten Puffer gemischt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0.2 μ l 3' primer (3' C γ 1 für schwere Ketten, 3' C κ 494 für leichte Ketten), 0.2 μ l 5' primer, 2.5 μ l 10x Puffer, 2.5 μ l dNTPs (25 mM) und 19.1 μ l destilliertes Wasser. Ausgewählte Bakterienkolonien wurden mit dem PCR Reaktionsgemisch vermischt. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde die Reaktion mit einem „hot start“, d.h. mit einer Anfang-

stemperatur von 94°C initiiert. Es wurden 35 Zyklen durchlaufen (Tabelle 3.4). Die PCR Produkte wurden durch Gelelektrophorese nachgewiesen.

Tabelle 3.4: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initialdenaturierung	94	10 min
Denaturierung	94	30 s
Anlagerung	58	30 s
Extension	72	60 s
End-Extension	72	10 min
Konservierung	4	∞

3.8.3 Gelelektrophorese

Von jeder PCR-Reaktion wurden 3 μ l PCR Produkt mit 3 μ l Ladepuffer gemischt und auf ein 2%iges Agarosegel (1.6 g Agarose, 40 ml 1x TAE Puffer, 2 μ l Ethidiumbromid) aufgetragen und bei 120 V in 1x TAE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.4 Plasmid Präparation

Nach Nachweis des korrekten Inserts, wurde die entsprechenden Bakterienkolonie verwendet, um die Plasmide zu präparieren. Plasmide wurden mit dem kommerziell erhältlichen QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) präpariert. Alle Schritte wurden entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden in 2 ml ampicillinhaltigem (100 μ g/ml) LB-Medium über Nacht bei 37°C vermehrt. Die Zellen wurden alkalisch lysiert, neutralisiert und das Lysegemisch auf eine Affinitätssäule aufgetragen, mit Waschpuffer gereinigt und anschließend mit 75 μ l des im Kit bereitgestellten Puffers eluiert. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

3.8.5 Antikörperexpression

Die humane embryonale Nierenzelllinie 293T (HEK293T) (ATCC, Kat. Nr.: CRL-11268) wurde zur Antikörperexpression verwendet. HEK293T Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) (Invitrogen), 1 mM Natriumpyruvat, 100 μ g/ml Streptomycin, 100 U/ml Penizillin G und 25 μ g Amphotericin (GibcoBRL) kultiviert. Für die Transfektion wurden 150 mM NaCl, 5 μ g Helfervektor, 20 μ g IgH bzw. IgL codierende Plasmid DNA 10 s intensiv gemischt. Anschließend wurde Polyethylenimin (PEI) (0.6 μ g/ μ l, 225 μ l) zum Transfektionsgemisch gegeben, 10 s gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die HEK293T Zellen wurden mit 10 ml serumfreien DMEM Medium gewaschen. Anschließend wurden 25 ml DMEM mit 1% Nutridoma-SP (Roche) langsam zu den Zellen gegeben und 2 ml des Transfektionsgemisches dazugetrofft. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Zellüberstand abgenommen und mit 0.05% NaN₃ versetzt. Weitere 25 ml DMEM mit 1% Nutridoma-SP (Roche)

wurde zu den Zellen gegeben und nach weiteren fünf Tagen wurde der Zellüberstand abgenommen und zum ersten Zellüberstand gegeben. Die gesammelten Zellüberstände wurden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und bis zur Aufreinigung bei 4°C gelagert.

3.8.6 IgG-ELISA des Zellüberstands

Die IgG Konzentration im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Dazu wurden Costar 96-well Mikrotiterplatten mit anti-human IgG (Dianova, Kat. Nr.: 109-005-098) (1.3 µg/ml, 50 µl pro well) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Nachdem dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit 100 µl Blockierungspuffer (PBS, 1 mM EDTA, 0.05% Tween20) für 1 h bei RT. Nach drei weiteren Waschschritten, wurden 50 µl der Proben- (50 µl Zellüberstand, 1:3 Verdünnung in PBS) und Standardverdünnungen (human IgG1 kappa, Sigma Aldrich, Kat. Nr.: I 5154, 6 µg/ml und 3 µg/ml, 1:3 Verdünnung in PBS) auf die Mikrotiterplatte übertragen und 3 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser, wurden 50 µl pro well des peroxydasemarkierten Sekundärantikörpers anti-human IgG-HRP (Dianova, Kat. Nr.: 109-035-098, 0.8 µg/ml) auf die Platte gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, kurz mit Blockierungspuffer inkubiert und abermals gewaschen. Nachdem 100 µl pro well Peroxydase-Substrat auf die Platte übertragen wurden, konnte nach 1-10 minütiger Inkubationszeit die Absorption bei 405 nm gemessen werden.

3.8.7 IgG-Aufreinigung

Die rekombinant hergestellten Antikörper wurden mit einem Protein-G Harz (GE Healthcare) entsprechend der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Dazu wurden 25 ml Zellüberstand mit 25 µl Protein-G Harz-Suspension versetzt und 14 h bei 4°C bei Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Harz auf eine Chromatographie-Zentrifugationssäule (BioRad) übertragen. Nachdem das Harz zweimal mit PBS gewaschen wurde, wurden die Antikörper mit 0.1 M Glycin (pH 3.0) in 3 Fraktionen (je 200 µl) eluiert, wobei das Eluat sofort mit 20 µl 1 M Tris (pH 8.0), 0.5% NaN₃ pro Fraktion neutralisiert wurde.

3.8.8 IgG-ELISA der aufgereinigten rekombinanten Antikörper

Die Konzentration der aufgereinigten rekombinanten Antikörper wurde mittels ELISA bestimmt. Costar 96-well Mikrotiterplatten wurden mit Fcγ spezifischen anti-human IgG (2 µg/ml in PBS, 50 µl pro well) (Jackson) über Nacht bei RT beschichtet. Nachdem die Platte dreimal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit Blockierungspuffer (TBS, 1% BSA) für 1 h bei RT, gefolgt von drei weiteren Waschschritten. Anschließend wurden 50 µl der Proben- (1:300 - 1:1000 Verdünnung in PBS, 1:3 Verdünnung in PBS) und Standardverdünnungen (human IgG1 kappa, Sigma Aldrich, Kat. Nr.: I5154, 6 µg/ml und 3 µg/ml, 1:3 Verdünnung in PBS) auf die Mikrotiterplatte übertragen und 3 h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS

Tabelle 3.5: Konzentration und Reaktivität der Antikörper aus IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen des gesunden Spenders PN. Die IgG Konzentration wurde durch ELISA bestimmt. * Die Reaktivität der Antikörper wurde von *Tiller et al.* [149] bestimmt (+ polyreaktiv, – nicht-reaktiv).

	Konzentration [mg/ml]		Reaktivität*	
	original	revertiert	original	revertiert
PN7	0.11	3.34	+	-
PN46	2.42	4.40	+	-
PN56	1.26	3.48	+	-
PN60	0.54	2.87	-	-
PN67	0.29	2.70	-	-

entfernt und anschließend wurden 50 μ l pro well des peroxydasemarkierten Sekundärantikörpers anti-human IgG-HRP (Dianova, Kat. Nr.: 109-035-098, 0.8 μ g/ml) auf die Platte gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen, 100 μ l pro well Peroxydase-Substrat (1-step ABTS, Invitrogen) auf die Platte übertragen, 1-10 min inkubiert und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die bestimmten Konzentrationen und die Reaktivität der Antikörper laut *Tiller et al.* [149] sind in Tabelle 3.5 angegeben.

3.8.9 SDS-PAGE

Ob die rekombinant hergestellten monoklonalen Antikörper in ihrer funktionalen Struktur vorliegen, wurde mit Natriumdodecylsulphat- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (Abb. 1, Anhang A). Dazu wurden 2 μ l der Lösung aufgereinigter Antikörper mit 5 μ l nicht-reduzierendem Probenpuffer und 3 μ l dest. H₂O bzw. 8 μ l reduzierendem Probenpuffer (enthält β -Mercaptoethanol) gemischt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 8% Acrylamidgel (Invitrogen) bei 125 V für ca. 105 min. Als interner Standard lief ein Molekulargewichtsmarker (Invitrogen) und als Kontrolle human IgG κ (Sigma Aldrich) mit. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie Färbung. Dazu wurde das Gel dreimal 10 min in dest. H₂O gewaschen, anschließend 1 h mit PageBlue Färbelösung (Fermentas) gefärbt und 5 min mit dest. H₂O entfärbt.

3.9 Antikörper Konjugation

Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG2b, anti-Maus-IgG2c und anti-Human-IgG1) wurden mit dem Antikörperkonjugationskit (Alexa Fluor 647 (546) Monoclonal Antibody Labeling Kit, Invitrogen) entsprechend der Anweisungen des Herstellers konjugiert. Die Reinigung erfolgte über Größenausschlusschromatographie. Die Konzentration, sowie der Markierungsgrad wurden photometrisch bestimmt (siehe Tabelle 2, Anhang A). Die Lagerung der Sekundärantikörper erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss.

3.10 Glasträger

Vier verschiedenen kommerziell erhältliche Glasträgertypen wurden in den Mikroarray-bindungsstudien verwendet. Diese unterscheiden sich durch das Trägermaterial und die Oberflächenfunktionalisierung. *Gnx*: Glasträger, Aldehyd-beschichtet (Genetix GmbH, Produktnummer: K2630), *Grn*: Plastikträger, Aldehyd-beschichtet (Greiner Bio-One GmbH, Produktnummer: 445845), *Eri*: Glasträger, Aldehyd-beschichtet (Eri Scientific GmbH, Produktnummer: 231643), *Crn*: Plastikträger, Epoxy-beschichtet (Corning Incorporated, Produktnummer: 40042).

3.11 Herstellung von Mikroarrays

Mikroarrays wurden von JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin zur Verfügung gestellt und teilweise kommerziell erworben. Die Synthese der Aminoxyacetyl- funktionalisierten Peptide erfolgte durch vollautomatische SPOT Synthese auf Zellulosemembranen [52, 86, 164]. Nach erfolgter Peptidsynthese wurden die Aminosäureseitenkettenschutzgruppen mit 90% TFA (Trifluoressigsäure) abgespalten und anschließend die festphasengebundenen Peptide in eine 96-well Mikrotiterfiltrationsplatte (Millipore, Bedford, USA) übertragen. Zur Ablösung der Peptide von der Zellulosemembran wurde 200 μ l wässrige Triethylaminlösung zugesetzt, die Lösung dann abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Peptidüberstand (50 nmol) wurde in 25 μ l Immobilisierungspuffer (70% DMSO, 25% 0.2 M Natriumacetat, pH 4.5, 5% Glycerin) aufgenommen und in 384-well Mikrotiterplatten transferiert. Die Peptid-Immobilisierung auf funktionalisierten Glasträgern erfolgte vollautomatisch durch einen Nicht-Kontakt-Immobilisierungsroboter (GESIM Nanoplotter, Großerkmannsdorf, Deutschland), wobei jeweils zwei Tropfen der Peptidlösung (0.5 nl, 1 mM) pro Spot durch piezoelektronische Nanospitzen (GESIM Nanotips, Großerkmannsdorf, Deutschland) auf den Glasträger aufgetragen wurden. Peptid Mikroarrays wurden 5 Stunden bei RT stehen gelassen, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und eine Stunde bei 42°C mit einer Quenchlösung (75 mM SSC Puffer, pH 7.0, 0.1 mg/ml BSA, 0.1% SDS, 750 mM NaCl) behandelt. Nach einem weiteren intensiven Waschschriff mit 1.5 mM SSC Puffer (pH 7.0) und destilliertem Wasser, wurden die Mikroarrays in einer Chipzentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.12 Peptidbibliotheken

3.12.1 CB4-1 Peptidbibliothek

Ein repräsentatives Repertoire bestehend aus 26 Epitop-homologen Peptiden und Mimotopen des murinen monoklonalen anti-p24 (HIV-1) Antikörpers CB4-1 wurde für die Untersuchungen, die in Abschnitt 4.1 beschrieben wurden, verwendet. Die Sequenzen der Peptide sowie die Bindungsdissoziationskonstanten pK_D der CB4-1-Peptid-Komplexe sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Die Herstellung der Peptide erfolgte durch SPOT-Synthese [52, 86, 164], die Bestimmung von pK_D durch SPR-Messungen [147].

Tabelle 3.6: Sequenzen der CB4-1 Peptidbibliothek, bestehend aus dem Epitop (ID=1) sowie Epitop-homologen und -nichthomologen Peptiden (Mimotope). Die Bindungsdissoziationskonstanten pK_D von CB4-1-Peptid-Komplexen wurden durch SPR-Messungen bestimmt.

ID	Peptidsequenz	pK_D	ID	Peptidsequenz	pK_D
1	GATPQDLNTML	8.00	14	LELIQDLNQKLQDGF	5.70
2	EAWVLRGAMILWKTD	3.52	15	GATPEDLNQKLAGN	9.00
3	EAWVLEGAMILWKTD	6.00	16	GLYEWGGARITNTD	6.70
4	TTMEWFRITDGARIM	5.70	17	RDFDKEWNLEQNS	5.70
5	ITDGARIM	4.05	18	GATPEDLNQKL	8.22
6	DYFDLTQDNIIERRN	4.00	19	GLKEWGGARIT	7.10
7	DYFDLTQDNIIITRRN	4.70	20	GATPEDLNAKL	7.05
8	DYFDLTQDNIIITRRL	5.05	21	DATPEDLNAKL	7.00
9	LEMKQDLNIMLQDGF	4.00	22	DATPEDLNARL	6.70
10	LEMKQDLNPMLQDGF	4.70	23	DALPEWGGARI	6.22
11	LEMKQDLNQMLQDGF	5.15	24	DALYEWGGARI	6.70
12	LEMKQDLNIKLQDGF	5.00	25	FATPEDLNQKL	7.70
13	LEMKQDLNQKLQDGF	5.30	26	FDKEWGGIRIT	7.00

3.12.2 Zufallspeptidbibliotheken

Es wurden zwei verschiedene Zufallspeptidbibliotheken verwendet (Tabelle 3.7). Peptidbibliothek P_{14+}^{300} besteht aus 255 14mer Peptiden, deren Aminosäurezusammensetzung semi-zufällig generiert wurde. Das heisst, die einzelnen Aminosäuren (inklusive Cystein) wurden mit genau der Häufigkeit mit der sie auf Proteinoberflächen vorkommen, in die Peptidsequenzen eingesetzt, wobei die Proteinoberfläche als der Teil von Proteinen definiert wurde, der für Solvenzien zugänglich ist. Die Frequenz der einzelnen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche wurde von Kristian Rother (Mathematische Systembiologie, Charité Berlin) berechnet [22]. Außerdem enthält die Peptidbibliothek 45 EAE Antigen-Peptide. Bei EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) handelt es sich um eine der humanen Multiplen Sklerose (MS) ähnlichen Erkrankung des Zentralnervensystems bei Mäusen und dient deshalb in der Forschung als Tiermodell für die MS.

Dagegen handelt es sich bei der Peptidbibliotheken $P_{13,15}^{9182}$ um eine echte Zufallsbibliothek, d.h. die einzelnen Aminosäure wurden zu gleichen Teilen (1/20) in die Peptide eingebaut, mit Ausnahme von Cystein, welches aus technischen Gründen durch die Hydroxy-Aminosäuren (S, T, Y) ersetzt wurde. Jede Bibliothek enthält außerdem Negativkontrollen, d.h. „leere“ Spots, durch Auftragen von ausschließlich Immobilisierungspuffer, Antikörperkontrollen (Maus-IgM, Maus-IgG (P_{14+}^{300}), Human-IgM, Human-IgG, Human-IgE, Human-IgA (P_{14+}^{300} , $P_{13,15}^{9182}$)), die in einer Konzentration von 500 ng/ml in 100 mM PBS, pH 8.0 aufgetragen wurden, sowie Fluoreszenzkontrollen, wobei es sich um ein mit Cy3 derivatisiertes Peptid handelt. Die Peptide und Kontrollen wurden in fünf (P_{14+}^{300}) bzw. drei ($P_{13,15}^{9182}$) identischen Replikaten auf jeden Glaträger aufgetragen. Auf die Zusammensetzung der Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ konnte keinen Einfluss genommen werden. Diese wurde von JPT (Berlin, Deutschland) entwickelt und käuflich erworben

Tabelle 3.7: Aminosäurezusammensetzung der Zufallspeptidbibliotheken P_{14+}^{300} und $P_{13,15}^{9182}$. Die absoluten (N) und die prozentualen Häufigkeiten jeder Aminosäure sind aufgelistet. Für die Analyse der Aminosäurezusammensetzung von Peptidbibliothek P_{14+}^{300} wurden ausschließlich die 255 Zufallspeptide berücksichtigt.

Peptidbibliothek	P_{14+}^{300}		$P_{13,15}^{9182}$	
Aminosäure	N	%	N	%
A	194	5.4	6731	5.1
C	52	1.5	0	0.0
D	254	7.1	6613	5.0
E	215	6.0	6579	4.9
F	157	4.4	6684	5.0
G	184	5.2	6823	5.1
H	144	4.0	6568	4.9
I	137	3.8	6829	5.1
K	260	7.3	6843	5.1
L	186	5.2	6665	5.0
M	85	2.4	6784	5.1
N	199	5.6	6612	5.0
P	181	5.1	6653	5.0
Q	177	5.0	6657	5.0
R	239	6.7	6597	5.0
S	232	6.5	8976	6.7
T	222	6.2	9684	7.3
V	177	5.0	6501	4.9
W	110	3.1	6591	5.0
Y	165	4.6	7732	5.8
Gesamt	3570	100	133122	100

und von André Dautcourt (ehemals AG Or-Guil) im Zuge einer Studienjahresarbeit analysiert.

3.13 Inkubation von Peptidmikroarrays

3.13.1 Manuelle Inkubation

Die Peptidarrays wurden kurz in 100% Ethanol und dann je dreimal für 2 min in T-PBS und destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Mikroarrays in Blockierungspuffer (PBS, 1% BSA) für 2 h bei RT blockiert, um unspezifische Bindung zu reduzieren und anschließend erneut je dreimal in T-PBS und destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem die Peptidarrays durch Zentrifugation getrocknet wurden, erfolgte die Inkubation mit der Probe in der entsprechenden Verdünnung in T-PBS für 2 h bei RT in einer Feuchtkammer, um ein Antrocknen der Probe zu verhindern. Daraufhin wurden die Peptidarrays wieder je dreimal mit T-PBS und destilliertem Wasser gewaschen, durch

Zentrifugation getrocknet und mit einem geeigneten fluorchrommarkierten Sekundärantikörper (300 μ l) 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, wurden die Peptidarrays durch Zentrifugation getrocknet und mit einem Mikroarrayscanner (GenePix 4000B oder GenePix 4200AL, Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland) bei 532 nm bzw. 635 nm (Emissionsfilter rot: 650-690 nm, grün: 550-600 nm) ausgelesen. Die Mikroarraybilder wurden im tif-Format gespeichert.

3.13.2 Vollautomatische Inkubation

Die automatische Inkubation erfolgte mit der Tecan HS 4800 Hybridisierungsstation (Tecan, Männedorf, Schweiz). Die Mikroarrays wurden mit T-PBS und mit Blockierungspuffer (PBS, 1% BSA) gewaschen und anschließend 30 min bei 30°C mit Blockierungspuffer blockiert. Nach drei weiteren Waschschriften mit T-PBS erfolgte die Injektion der Probe und die anschließende Inkubation für 2-3 h bei 30°C unter ständiger Agitation der Flüssigkeit. Danach wurden die Mikroarrays viermal mit T-PBS gewaschen und anschließend eine Lösung des Sekundärantikörpers injiziert. Dieser wurde für 1 h bei 30°C unter ständiger Agitation der Flüssigkeit inkubiert. Die Mikroarrays wurden dann dreimal mit T-PBS und zweimal mit 0.01x SSC Puffer gewaschen, 3 min mit dest. H₂O gespült und anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Bindungssignale wurden mit einem Mikroarrayscanner (GenePix 4000B oder GenePix 4200AL, Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland) bei 532 nm bzw. 635 nm (Emissionsfilter rot: 650-690 nm, grün: 550-600 nm) ausgelesen. Die Mikroarraybilder wurden im tif-Format gespeichert.

3.14 Messung von Signalintensitäten

Die Signalintensitäten der einzelnen Spots wurden mit der Scanner-assoziierten Software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland) bzw. mit GeneSpotter (MicroDiscovery GmbH, Berlin, Deutschland) bestimmt und ausgewertet. Über das Chipbild wird ein Koordinatengitter gelegt, so dass jedem Spot seine Position und Peptidsequenz zuordnet werden kann. Da sowohl die Spotpositionen als auch die Spotgrößen variieren können, stellt die Software GenePix Pro 6.0 eine automatische Gittersuchfunktion zur Verfügung, die das Gitter und den Radius entsprechend anpasst. Die Signalintensität wird dann aus der mittleren Pixelintensität des definierten Spotbereiches berechnet. GenePix stellt sowohl den Mittelwert als auch den Median der Pixelintensität zur Verfügung. Da der Median robuster gegenüber Ausreißern ist, wurde stets der Median als Maß für die Spotsignalintensität (SI) verwendet. Die Hintergrundsignalintensität berechnet sich aus der mittleren Pixelintensität im Bereich des vierfachen Spotdurchmessers abzüglich eines Sicherheitsabstands von jeweils zwei Pixel zu benachbarten Spots (siehe Abb. 4.13-A).

3.15 Datenprozessierung

3.15.1 Eliminierung falschpositiver Signale

Ein Maß dafür, dass ein Bindungssignal sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet ist das Signal-Rausch-Verhältnis (*engl.* Signal-to-Noise-Ratio, SNR). Das Signal-Rausch-Verhältnis ist das Verhältnis der Größe des Signals (Signalintensität) zur Größe des Rauschens (Hintergrundsignalintensität). Die Mikroarrayanalysesoftware GenePix Pro 6.0 bestimmt SNR als:

$$SNR = \frac{SI(x) - BG(x)}{SD(BG(x))} \quad (3.1)$$

wobei $SI(x)$ die mittlere Signalintensität jedes Spots x , $BG(x)$ die mittlere Signalintensität des lokalen Hintergrunds und $SD(BG(x))$ die Standardabweichung der Hintergrundsignalintensität ist.

Falschpositive Signale sind solche, die bei einer Blank-Inkubation (ohne Probe) eine signifikant von der Hintergrundsignalintensität verschiedene Signalintensität aufweisen, d.h. deren $SNR > 3$ ist. Diese Peptide wurden als falschpositiv definiert, aus allen Datensätzen eliminiert und nicht für die weitere Analyse berücksichtigt.

3.16 Statistische Datenanalyse

3.16.1 Korrelationskoeffizienten

Korrelationskoeffizienten wurden mit der Funktion *corrcoef* in Matlab 7.10 berechnet.

3.16.2 Bestimmung von Normalverteilung

Die statistischen Datenverteilung wurde durch Gauss-Fit der logarithmierten Signalintensitäten und durch Vergleich gegen eine Standardnormalverteilung in Quantil-Quantil-Diagrammen bestimmt.

3.16.3 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Hauptkomponenten wurden mit der Funktion *princomp* von Matlab 7.10 berechnet.

3.16.4 Lineare Diskriminanten Analyse (LDA)

LDA wurde mit den Funktionen *lda* und *predict.lda* von R 2.7.1. berechnet. Die Option *prior* wurde zur Eliminierung des systematischen Fehlers, der infolge der unterschiedlichen Gruppengrößen entstehen würde, immer auf gleichberechtigte Wahrscheinlichkeiten gesetzt.

3.16.5 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität (Gleichung 3.2) und Spezifität (Gleichung 3.3) einer diagnostischen Vorhersage wurden bestimmt als:

$$\text{Sensitivität} = \frac{rp}{rp + fn} \quad (3.2)$$

$$\text{Spezifität} = \frac{rn}{rn + fp} \quad (3.3)$$

wobei rp die Anzahl der richtig positiv, rn die Anzahl der richtig negativ, fp die Anzahl der falsch positiv und fn die Anzahl der falsch negativ klassifizierten bzw. vorhergesagten Datenpunkte bezeichnen.

3.16.6 Merkmalsselektion und Kreuzvalidierung

Die Merkmalsselektion erfolgte mit dem Algorithmus Potential Support Vector Machine (P-SVM) [68–70], einer überwachten Maschinenlernmethode, die auf dyadische Datensätze angewendet werden kann. Die in dieser Arbeit analysierten Datensätze liegen als Rechtecksmatrizen vor, deren Einträge Signalintensitäten sind, die die Beziehung der klassenzugehörigen Proben (Seren) zu den Analyten (Peptide) beschreiben, wobei die Analyten als Deskriptoren (Merkmale) der Proben dienen. P-SVM selektiert kleine informative Datensätze (Merkmalsselektion), wobei die Anzahl auszuwählender Merkmale (Peptide) auf 10 begrenzt wurde. Für jedes selektierte Merkmal gibt P-SVM die Anzahl der sowohl richtig positiv und negativ als auch falsch positiv und negativ klassifizierten Proben, sowie die Fehlerrate der Klassifizierung an.

Die Bestimmung der diagnostischen Zuverlässigkeit erfolgte durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung, wobei in einem Datensatz mit n Proben, mit $n-1$ Datenpunkten Merkmalsselektion durchgeführt und anschließend der n -te Datenpunkt mit den selektierten Merkmalen vorhergesagt wurde. Diese Prozedur wurde n Mal durchgeführt, so dass jeder Datenpunkt einmal vorhergesagt wurde. Dabei werden für unterschiedliche $n-1$ Trainingsdatensätze geringfügig verschiedene Merkmalsgruppen gewählt, aus denen nach n Durchgängen, je nach Häufigkeit der einzelnen Merkmale, charakteristische Merkmalsgruppen ermittelt werden. Für jede selektierte Merkmalsgruppe, bestehend aus 1 bis 10 Peptiden, gibt P-SVM einen Mittelwert für die Anzahl der sowohl richtig positiv und negativ als auch falsch positiv und negativ vorhergesagten Proben für alle Datenpunkte, sowie die Fehlerrate der Vorhersage an.

3.16.7 Signifikanz der Klassifizierung und Diagnose mit P-SVM

Die Signifikanz der Klassifizierungsgenauigkeit und diagnostischen Zuverlässigkeit mit den bestimmten Merkmalen wurde durch zufälligen Austausch der Gruppenkennzeichnung jedes Datenpunktes getestet (*label shuffling*), wobei die Anzahl der ausgetauschten Gruppenlabels immer mindestens halb so groß ist, wie die Hälfte der Anzahl der Proben in der kleineren Gruppe. Der so entstandene, vermischte Datensatz wird mit P-SVM auf

ebenso gute oder bessere Klassifizier- bzw. Vorhersagbarkeit getestet. Dieses Verfahren wurde 1000 Mal wiederholt. Die Signifikanz p der Klassifizierungsgenauigkeit und der diagnostischen Zuverlässigkeit berechnet sich dann aus der Anzahl der Male, bei der eine genauso gute oder bessere Klassifizierungsgenauigkeit bzw. diagnostischen Zuverlässigkeit erhalten wurde, geteilt durch 1000.

3.16.8 Epitopsuche - BLAST

NCBI blastp 2.2.25+ Analysen wurden für alle identifizierten klassifizierenden Peptide durchgeführt [3]. Die Aminosäuresequenzen wurden gegen eine nicht-redundante Proteinsequenzdatenbank, die auf Maus- (*GP/10090.9559/RefSeq-protein*) bzw. Humanproteine (*GP/9606.9558/RefSeq-protein*) beschränkt war, abgeglichen. Die maximale Trefferzahl, die Sequenzidentität sowie die Signifikanz der Treffer (E-Wert) wurden bestimmt (siehe Tabelle 5, Anhang A).

4 Ergebnisse und Diskussion I: Mikroarray-Technologie

4.1 Analyse von Bindungsprofilen monoklonaler Antikörper gegenüber Epitopeptidbibliotheken

4.1.1 Reproduzierbarkeit der Messung von Antikörper-Peptid-Interaktionen

An einem Testsystem, bestehend aus 26 Glasträger-gebundenen Peptiden (Epitop, Epitop-homologe und -nichthomologe Peptide) und dem gegen diese Peptide gerichteten monoklonalen Antikörper CB4-1, wurde die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten innerhalb eines und zwischen verschiedenen Glasträgern untersucht.

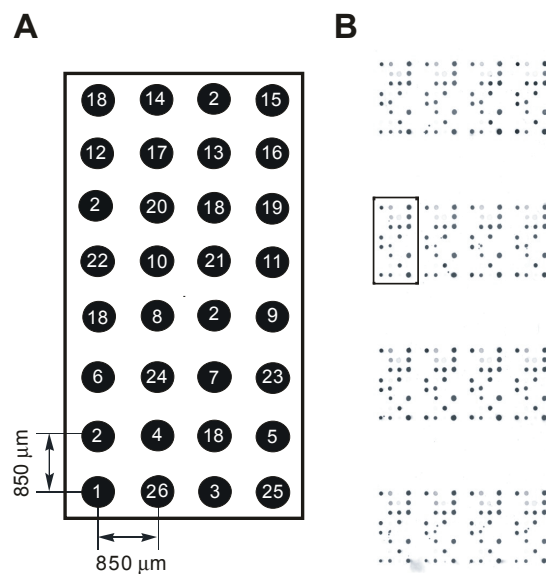


Abbildung 4.1: Mikroarray Design. **A:** Ein repräsentativer Satz von 26 CB4-1-bindenden Peptiden wurde in einer 4 x 8 Matrix auf Glasträgern immobilisiert. Ein hochaffines Peptide (ID 18) und eine niedrigaffines Peptid (ID 2) wurden als Kontrollen in jeweils vier Replikaten auf jedem Peptidfeld integriert. **B:** Auf jeden Glasträger wurden 16 identische Peptidfelder gedruckt. Der bedruckte Glasträger wird mit dem monoklonalen Antikörper CB4-1 inkubiert. Eine Antikörper-Peptid-Bindung wird über ein Fluoreszenzsignal unter Verwendung eines fluorochrommarkierten Sekundärantikörpers detektiert. Entnommen aus *Tapia und Bongartz et al.* [147].

Der monoklonale Antikörper CB4-1 ist gegen das p24 Antigen (HIV-1) der Maus gerichtet und wurde bereits in zahlreichen Studien auf dessen Bindungseigenschaften hin untersucht [66, 84]. Dabei wurden zahlreiche bindende Peptide identifiziert [71, 85, 129], aus denen ein repräsentativer Satz von 26 Peptiden (Tabelle 3.6) für diese Untersuchung so ausgewählt wurde, dass ein möglichst großer Affinitätsbereich gleichmäßig abgedeckt wurde [163]. Die Affinität der jeweiligen Antikörper-Peptid-Komplexe ist in Tabelle 3.6 als negativer dekadischer Logarithmus der Bindungsdissoziationskonstante K_D aufgelistet ($pK_D = 3.52 - 9.00$).

Unter Verwendung der Peptid-Drucktechnologie [138] wurden diese Peptide auf Glasträgern verschiedener Glasträgerhersteller (*Gnx*, *Eri*, *Grn*, *Crn*), wie in Abb. 4.1 dargestellt, immobilisiert. Auf jeden Glasträger wurden 16 identische Peptidfelder gedruckt, wobei ein Peptidfeld aus den 26 Peptiden zusammengesetzt ist, die in einer Matrix von 4x8 Peptiden angeordnet sind. Zusätzlich wurden als interne Kontrollen ein niedrigaffines Peptid (ID 2) und ein hochaffines Peptid (ID 18) in jeweils vier Replikaten, verteilt auf dem Peptidfeld, aufgetragen. Der bedruckte Glasträger wird im Folgenden als (Peptid-) Mikroarray bezeichnet.

Vier Replikate jedes Mikroarraytyps (*Gnx*, *Eri*, *Grn* und *Crn*) wurden an zwei verschiedenen Tagen (je zwei Replikate pro Tag) mit dem monoklonalen Antikörper CB4-1 inkubiert. Über ein Fluoreszenzsignal konnte die Bindung des Antikörpers an jedes der Peptide detektiert und durch Messen der Signalintensität (SI) quantifiziert werden (Signalintensitätshistogramme siehe Abb. 2, Anhang B).

Da jedes Peptid auf einem Mikroarray in mindestens 16 Replikaten vorliegt, kann der Mittelwert der Signalintensität, sowie deren Standardabweichung für jedes Peptid berechnet werden. Die so bestimmte Variabilität der Signalintensität innerhalb jedes Mikroarrays (intra-Mikroarray Variabilität) ist in Abb. 4.2 in Form des Variationskoeffizienten (CV) dargestellt. Für jedes Mikroarray wurde der Mittelwert der Signalintensität gegen den Variationskoeffizienten aufgetragen. Die gepunktete Linie spiegelt den Mittelwert des CV über alle Replikate eines Mikroarraytypen wider (siehe auch Tabelle 4.1).

Insgesamt konnte ein relativer Fehler von 28% bestimmt werden. Im Allgemeinen unterliegen kleine Signalintensitäten einem größeren relativen Fehler als hohe Signalintensitäten. Dies spiegelt sich in wesentlich vom Mittelwert abweichenden Variationskoeffizienten wider (2 bis 5 mal größer), während die Variationskoeffizienten für hohe Signalintensitäten eher um den Mittelwert des CV verteilt sind.

Die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten zwischen verschiedenen Mikroarrays eines Typs (inter-Mikroarray Variabilität) wurde für verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Die jeweils vier Mikroarrays der Datensätze *Gnx* und *Eri* gehören zu der gleichen Produktionscharge, d.h. sie wurden in einem Produktionslauf bedruckt, während jeweils zwei der vier Mikroarrays der Datensätze *Grn* und *Crn* an unterschiedlichen Tagen bedruckt wurden, und somit zu unterschiedlichen Produktionschargen gehören. Des Weiteren wurden die Mikroarrays jeweils in Replikatpaaren an unterschiedlichen Tagen inkubiert. Dieses experimentelle Design ermöglicht, das Ausmaß von produktionsbedingten und experimentellen Einflussfaktoren zu untersuchen.

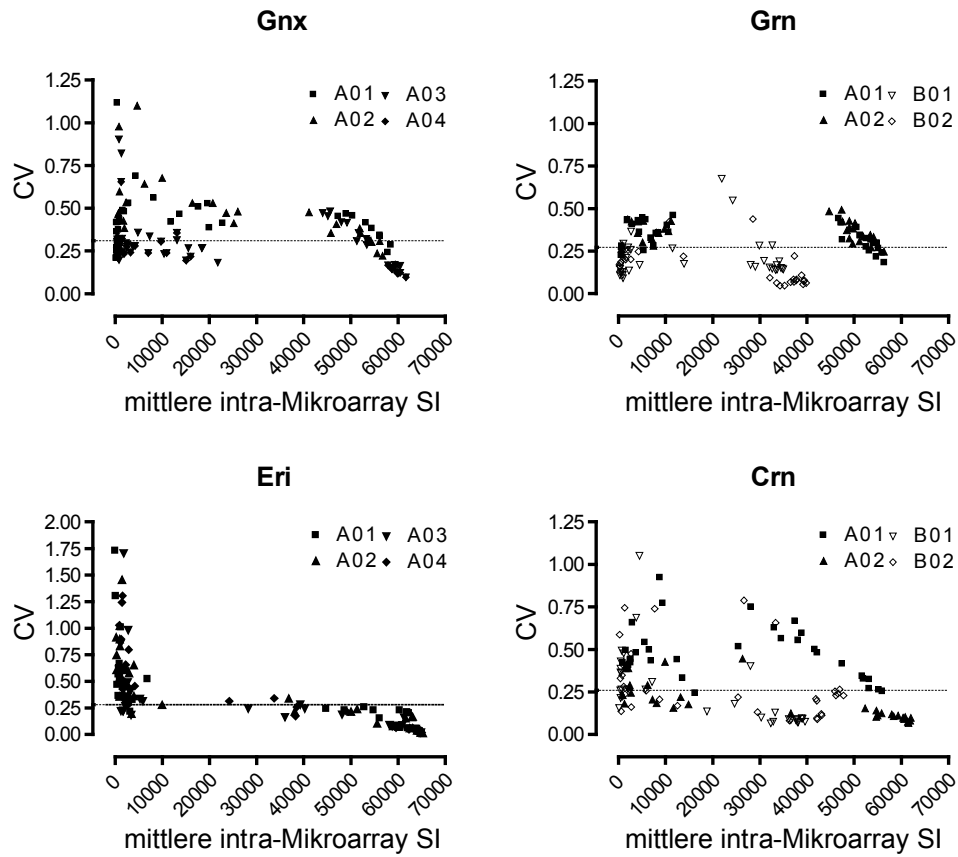


Abbildung 4.2: Intra-Mikroarray-Variabilität der Signalintensität für vier kommerziell erhältliche Glas-trägertypen. Für jeden Mikroarraydatensatz ist der Variationskoeffizient (CV) der 26 peptidassoziierten mittleren Signalintensitäten für vier Wiederholungsmessungen dargestellt. Die gepunkteten Linien repräsentieren den mittleren CV über alle Replikate eines Datensatzes. *Gnx*, *Eri*: Alle Wiederholungsmessungen (A01-A04) wurden auf Mikroarrays durchgeführt, die zur selben Produktionscharge gehören. Replikatpaare wurden an verschiedenen Tagen inkubiert. *Grn*, *Crn*: Die Wiederholungsmessungen (A01-A02, B01-B02) wurden auf Mikroarrays durchgeführt, die zur verschiedenen Produktionschargen (A, B) gehören (leere und gefüllte Symbole). Replikatpaare wurden an verschiedenen Tagen inkubiert. Entnommen aus *Tapia und Bongartz et al.* [147].

Die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten zwischen verschiedenen Mikroarrays kann durch den Korrelationskoeffizienten (r^2) ausgedrückt werden (Tabelle 4.1). Die Korrelationskoeffizienten (r^2) für alle Replikatpaare innerhalb jedes Mikroarray Datensatzes wurden bestimmt und ergaben Werte von 0.95-0.99 (*Gnx*), 0.87-0.99 (*Grn*), 0.95-0.99 (*Eri*) und 0.79-0.96 (*Crn*). Deren jeweilige Mittelwerte (Tabelle 4.1) wurden zur Einschätzung der Qualität jedes Mikroarray-Datensatzes herangezogen. Die größte Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten wurde für die Aldehyd-funktionalisierten Mikroarray-Datensätze (*Gnx*, *Eri* und *Grn*) gefunden. Die Gründe für die geringere Reproduzierbarkeit innerhalb des *Crn* Datensatzes werden in Abschnitt 4.4 diskutiert. Der Mittelwert über alle Korrelationskoeffizienten ($r^2=0.94$) illustriert die außerordentlich gute Reproduzierbarkeit von Antigen-Antikörper-Bindungsstudien auf Peptid-Mikroarrays.

Tabelle 4.1: Intra-Mikroarray-Variabilität und Reproduzierbarkeit von *SI*-Messungen. Die Intra-Mikroarray-Variabilität wird durch den mittleren Variationskoeffizienten (CV) für peptidassoziierte Signalintensitäten innerhalb jedes Mikroarrays für je vier Wiederholungsmessungen angegeben. Die Reproduzierbarkeit von Signalintensitäten zwischen verschiedenen Mikroarrays jedes Typs wird durch den mittleren Korrelationskoeffizienten (r^2) beschrieben.

Mikroarray Datensatz	Intra-Mikroarray Variabilität (CV)	Reproduzier- barkeit (r^2)
Gnx	0.31 ± 0.177	0.98 ± 0.013
Grn	0.26 ± 0.184	0.92 ± 0.055
Eri	0.29 ± 0.469	0.98 ± 0.017
Crn	0.25 ± 0.206	0.88 ± 0.060

Zur graphischen Veranschaulichung wurde die mittlere intra-Mikroarray Signalintensität jedes Mikroarrays gegen die mittlere Gesamtsignalintensität aller Mikroarrays des jeweiligen Typs aufgetragen (Abb. 4.3).

Allein durch den Korrelationskoeffizienten kann jedoch noch keine Aussage über die Reproduzierbarkeit der absoluten Signalintensitäten von verschiedenen Mikroarrays getroffen werden. Signale, die in ihrer Intensität verschoben sind, können trotzdem gut korreliert sein. Jedoch würde eine Signalversetzung eine Normierung der Daten erfordern, um sie miteinander vergleichbar zu machen. Eine gute Reproduzierbarkeit der absoluten Signalintensität zeigt sich in Abb. 4.3 darin, dass die einzelnen Datenpunkte nicht stark von der Winkelhalbierenden abweichen.

Wie in den Datensätzen *Gnx* und *Eri* verdeutlicht wird, ist der Einfluss verschiedener Inkubationstage auf die Reproduzierbarkeit der Signalintensität sehr klein. Jedoch können Replikate, die aus verschiedenen Produktionschargen stammen, sich stark in der absoluten mittleren Signalintensität unterscheiden (Datensatz *Grn*). Im Datensatz *Crn* weichen die einzelnen Datenpunkte, nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb von Produktionschargen stark von der Winkelhalbierenden ab.

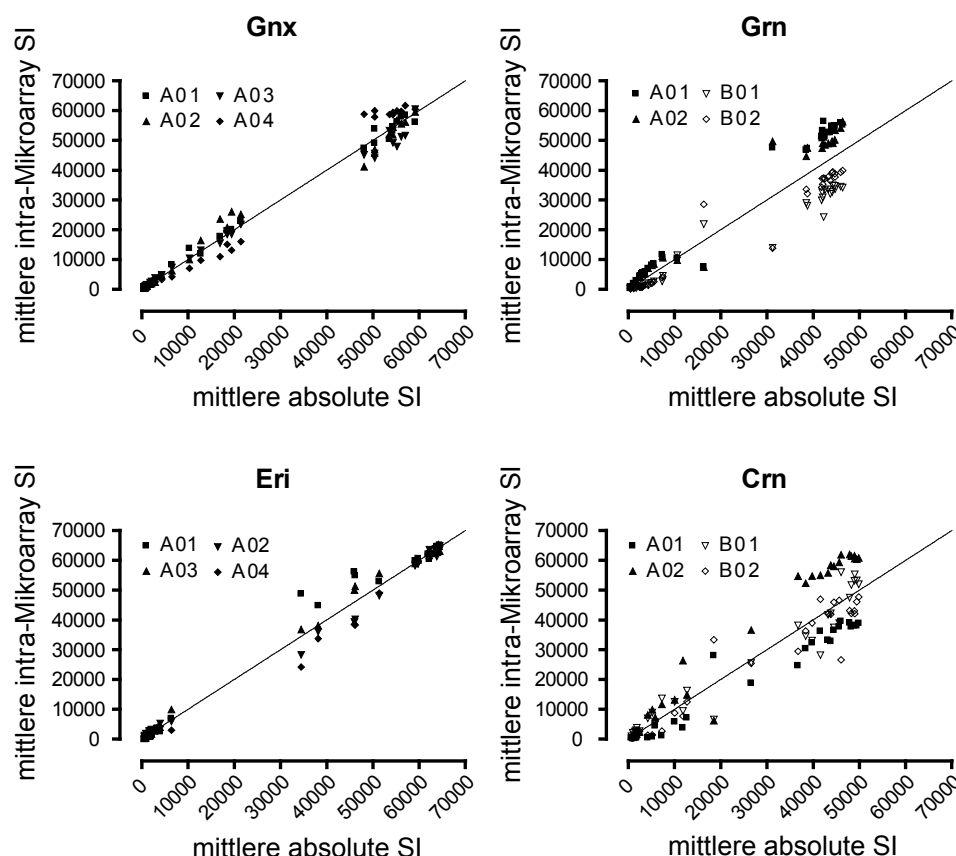


Abbildung 4.3: Reproduzierbarkeit von peptidassoziierten Signalintensitäten aus vier Wiederholungsmessungen. *Gnx*, *Eri*: Alle Wiederholungsmessungen (A01-A04) wurden auf Mikroarrays durchgeführt, die zur selben Produktionscharge gehören. Replikatpaare wurden an verschiedenen Tagen inkubiert. *Grn*, *Crn*: Die Wiederholungsmessungen (A01-A02, B01-B02) wurden auf Mikroarrays durchgeführt, die zur verschiedenen Produktionschargen (A, B) gehören (leere und gefüllte Symbole). Replikatpaare wurden an verschiedenen Tagen inkubiert. Die mittlere intra-Mikroarray Signalintensität jedes Mikroarrays wurde gegen die mittlere Gesamtsignalintensität aller Mikroarrays des jeweiligen Typs aufgetragen. Die Winkelhalbierenden wurden in allen Graphen eingezeichnet, um die Reproduzierbarkeit der Signalintensität zwischen verschiedenen Replikaten direkt zu veranschaulichen. Die mittleren Korrelationskoeffizienten (r^2) sind in Tabelle 4.1 gezeigt. Entnommen aus *Tapia und Bongartz et al.* [147].

4.1.2 Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays

Die Peptid-Mikroarray Technologie findet bisher vor allem in qualitativen Bindungsstudien, wie der Identifizierung von Biomarkern und Epitopen oder von Enzym-Substrat-Spezifitäten Verwendung. Nur wenige Studien beschäftigen sich mit der quantitativen Bestimmung von Affinität oder Enzymaktivität mittels Mikroarray-Bindungsstudien [72, 78].

Hier stellt sich die Frage, inwieweit die gemessene Signalintensität für einen Antikörper-Peptid-Komplex dessen Bindungsstärke wiedergibt. In diesem Abschnitt wird erstmals die Zuverlässigkeit quantitativer Bindungsstudien mittels Mikroarrays untersucht.

Das verwendete Modellsystem, das bereits für die Untersuchungen in Abschnitt 4.1.1 benutzt wurde, besteht aus dem anti-Maus-p24 (HIV-1) Antikörper CB4-1 (Analyt) und einem Satz von 26 CB4-1-bindenden Peptiden, die auf Aldehyd-funktionalisierten Glaträgern immobilisiert wurden (Abb. 4.1). Für diese Untersuchungen wurden *Gnx*-Glaträger derselben Produktionscharge verwendet, da sie, wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, den qualitativen Ansprüchen von allen untersuchten Mikroarraytypen am Besten genügen. Die Affinität von CB4-1 zu jedem dieser Peptide wurde durch SPR-Messungen bestimmt (Tabelle 3.6). Das Peptidrepertoire deckt einen Affinitätsbereich von ca. $K_D = 1 \text{ mM} - 1 \text{ nM}$ ($pK_D = 3.52 - 9.00$) ab.

CB4-1 wurde in einer Konzentrationsserie von fünf verschiedenen Konzentrationen inkubiert ($3.34 \mu\text{M}$, 667 nM , 66.7 nM , 6.67 nM und 667 pM) (Signalintensitätshistogramme siehe Abb. 3, Anhang B). Die peptidassoziierten mittleren Signalintensitäten wurden für alle Konzentrationen bestimmt und gegen den zugehörigen pK_D -Wert aufgetragen. In Abb. 4.4-A und 4.4-B ist dies für zwei Beispieldatensätze ($3.34 \mu\text{M}$ und 667 pM) dargestellt.

Inwieweit die Bindungsdissoziationskonstante durch die Signalintensität wiedergegeben werden kann, wurde durch nichtlineare Regression der experimentellen Daten an ein Bindungsmodell, das sich vom Massenwirkungsgesetz ableitet, beschrieben. Das Modell basiert auf einer nichtlinearen Beziehung zwischen der Bildung von Antikörper-Peptid-Komplexen als Funktion der Bindungsdissoziationskonstante (Gleichung 4.1). Der Parameter $[AP]$ beschreibt die effektive Konzentration des gebildeten Komplexes zwischen Antikörper A und Peptid P , wobei $[P]$ die effektive Peptidkonzentration und $[A]_i$ die absolute Antikörperkonzentration der jeweiligen, bei den fünf Antikörperkonzentrationen durchgeführten Untersuchung i bezeichnet.

$$[AP] = \frac{[A]_i + [P] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([A]_i + [P] + K_D)^2}{4} - [A]_i \cdot [P]} \quad (4.1)$$

Des Weiteren beschreibt das Modell eine lineare empirische Relation zwischen Signalintensität SI und der Antikörper-Peptid-Komplex-Konzentration (Gleichung 4.2). Es wird angenommen, dass SI proportional zu $[AP]$ ist, wobei es sich bei α um einen Proportionalitätsfaktor handelt und die Konstante β die Hintergrund-Signalintensität bei Nichtvorhandensein von Antikörper-Peptid-Komplexen, beschreibt.

$$SI = \alpha \cdot [AP] + \beta \quad (4.2)$$

Das Modell ist stark vereinfacht, da angenommen wird, dass der Antikörper nur auf einen Bindungspartner trifft. Dass auf einem Peptid-Mikroarray viele verschiedene Peptide um die Bindung des Antikörpers konkurrieren, wurde hier nicht berücksichtigt.

Das Modell wurde auf die experimentellen Daten angewendet, wobei alle Parameter unbeschränkt gelassen wurden. Die resultierende Regressionskurve generiert theoretische Werte der Signalintensität, die idealerweise die Antikörper-Peptid-Komplex-assoziierten Bindungssignale repräsentieren. Exemplarisch sind für zwei Antikörperkonzentrationen

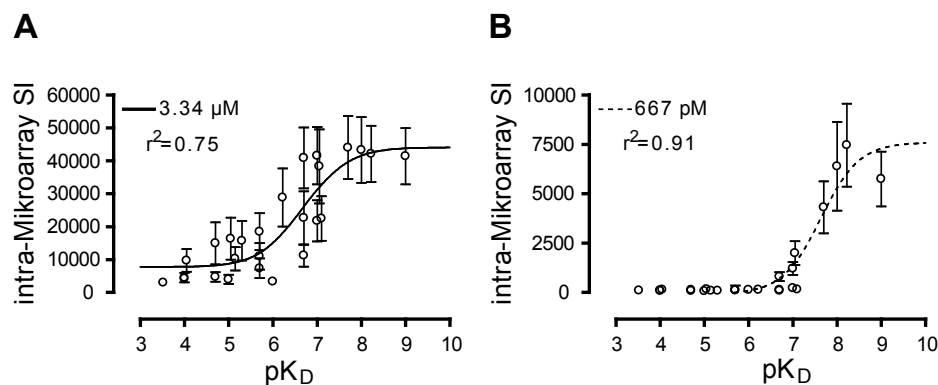


Abbildung 4.4: Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays. Die peptidassoziierten Signalintensitäten sind gegen die Bindungsdissoziationskonstante für die höchste (A) und niedrigste (B) verwendete Antikörperkonzentration aufgetragen. Die Regressionskurven wurden durch Anwendung von Gleichung 4.2 erzeugt, wobei alle Parameter unbeschränkt gelassen wurden. Die Genauigkeit der Signalintensitätsmessungen wird durch den Korrelationskoeffizienten (r^2) wiedergegeben. Entnommen aus *Tapia und Bongartz et al.* [147].

Tabelle 4.2: Regressionskoeffizienten der Datenregression mit Gleichung 4.2 bei fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen.

[A] (M)	r^2
6.67e-10	0.91
6.67e-09	0.82
6.67e-08	0.77
6.67e-07	0.75
3.34e-06	0.75

(3.34 μ M und 667 pM) die Diagramme zur Darstellung der peptidassoziierten mittleren Signalintensitäten als Funktion der Bindungsdissoziationskonstante, sowie die jeweiligen Regressionskurven gezeigt (Abb. 4.4).

Inwieweit die gemessene Signalintensität für einen Antikörper-Peptid-Komplex dessen Bindungsstärke wiedergibt, wird durch die Genauigkeit der Datenregression, also durch den Korrelationskoeffizienten (r^2) wiedergegeben (Tabelle 4.2). Der Korrelationskoeffizient rangiert für die fünf Antikörperkonzentrationen in der Größenordnung von $r^2 = 0.75$ (3.34 μ M) bis $r^2 = 0.91$ (667 pM) und beträgt im Mittel $r^2 = 0.80$. Die Genauigkeit der Datenregression erhöht sich, je geringer die verwendete Antikörperkonzentration ist. Bei hohen Antikörperkonzentrationen (3.34 μ M) sind die Hintergrundsignale im Vergleich zu den Messungen bei niedrigeren Konzentrationen erhöht. Zum anderen sind die Signalintensitäten für starke Binder ($pK_D = 7.5 - 9$) verkleinert. Diese Effekte werden in Abschnitt 4.4 diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsstärke eines Antikörper-Peptid-Komplexes sehr genau durch die gemessene Signalintensität wiedergegeben werden kann. Sie verdeutlichen aber auch, dass die Verwendung geringer Konzentrationen die Genauigkeit

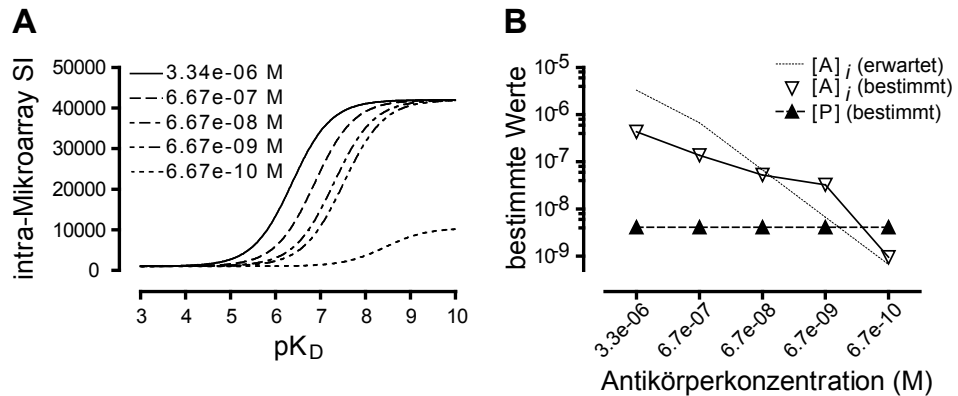


Abbildung 4.5: Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen. **A:** Die Kurven wurden durch Regression der peptidassoziierten Signalintensitäten bei fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen erzeugt, wobei die Parameter α , β und die effektive absolute Peptidkonzentration $[P]$ global beschränkt wurden, was eine genauere Bestimmung von $[A]_i$ ermöglicht. **B:** Die Konzentrationen $[P]$ und $[A]_i$ wurden bestimmt und mit der eingesetzten Antikörperkonzentration verglichen. Für die kleinste verwendete Antikörperkonzentration (667 pM) resultiert $[A] < [P]$, was auf eine Nichtsättigung der Signale für stark bindende Peptide hinweist. Für hohe Antikörperkonzentrationen ist $[A]_i$ ca. acht mal kleiner als die erwartete Antikörperkonzentration (gepunktete Linie). Entnommen aus *Tapia und Bongartz et al.* [147].

von Signalintensitätsmessungen mit Mikroarrays erhöhen.

4.1.3 Stabilität peptidassoziierten Signalintensitäten bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen

In Abschnitt 4.1.2 wurde bereits gezeigt, dass sich die Qualität der Datenregression bei verschiedenen Antikörperkonzentration unterscheiden kann. Im Folgenden soll nun genauer untersucht werden, wie sich die verwendete Antikörperkonzentration auf die Qualität der Datenregression auswirkt. Dazu wurden alle 26 peptidassoziierten Signalintensitäten bei fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen (Versuchsaufbau siehe Abschnitt 4.1.2) dahingehend analysiert, inwieweit sie die eingesetzten Antikörperkonzentrationen wiedergeben.

Da das hierzu verwendete Modell (Gleichungen 4.1-4.2) vier verschiedene Parameter enthält, was zu einer enormen Komplexität führt, wurde es dahingehend vereinfacht, dass der Skalierungsfaktor α sowie der Hintergrundfaktor β für alle Datensätze denselben Wert annehmen. Des Weiteren wurde angenommen, dass der Parameter $[P]$, der die effektive absolute Peptidkonzentration repräsentiert, für alle Datensätze konstant ist. Diese Annahme ist jedoch kritisch, denn obwohl alle verwendeten Mikroarrays zu derselben Produktionscharge gehören, können sie unterschiedliche Peptiddichten aufweisen, was die Sensitivität der Signalintensitätsmessung beeinträchtigen kann [80].

Das so veränderte Modell wurde an die experimentellen Daten angepasst und führte zu Veränderungen des Verlaufs der Regressionskurven für die höchste (3.34 μ M) und niedrigste (667 pM) verwendete Antikörperkonzentration (Abb. 4.5-A). Für die höchste (3.34 μ M)

Antikörperkonzentration konnte dadurch, dass der Hintergrundfaktor β konstant gehalten wurde, der Effekt unspezifischer Bindung auf die Regressionskurve korrigiert werden. Für die niedrigste (667 pM) verwendete Antikörperkonzentration wurde die maximale Signalintensität auf einen neuen Wert gesetzt, der durch den Skalierungsfaktor α definiert wurde. Für die mittleren Antikörperkonzentrationen (667 nM, 66.7 nM und 6.67 nM) blieb der Kurvenverlauf auch unter Beschränkung der Parameter erhalten. Man kann deshalb annehmen, dass die Peptiddichte auf diesen Mikroarrays homogen ist.

Für jeden Datensatz konnten die Konzentrationen $[P]$ und $[A]_i$ mit Hilfe des Modells bestimmt und mit der tatsächlich eingesetzten Antikörperkonzentration verglichen werden (Abb. 4.5-B). Für eine verwendete Antikörperkonzentration von 667 pM berechnet das Modell die Parameter $[P]$ und $[A]_i$ so, dass $[A] < [P]$ ist, was auf eine Nichtsättigung der Signale für stark bindende Peptide hinweist. Die Güte dieser Herangehensweise wird durch eine gute lineare Korrelation zwischen erwarteter und bestimmter Antikörperkonzentration ($r^2 = 0.99$) ausgedrückt. Dennoch fällt für große Antikörperkonzentrationen auf, dass die ermittelten Werte für $[A]_i$ ca. acht mal kleiner sind als die Werte für die verwendete Antikörperkonzentration. Für die Regressionskurven in Abb. 4.5-A bedeutet dies, dass die Kurven, im Vergleich zum erwarteten Verlauf, „zu weit nach rechts“ verschoben sind, was zu einer Unterschätzung der Signalintensitäten für schwach bindende Peptide führt. Im Gegensatz dazu sind für kleine Antikörperkonzentrationen die Kurven, im Vergleich zum erwarteten Verlauf, „zu weit nach links“ verschoben, was zu einer Überschätzung der Signalintensitäten führt.

4.1.4 Quantitative Bestimmung von Affinität mittels Peptid-Mikroarrays

Die quantitative Bestimmung der Bindungsstärke eines Antikörper-Peptid-Komplexes unter Verwendung von Peptid-Mikroarrays erfordert die Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration des Antikörper-Peptid-Komplexes bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Die Gleichgewichtskonzentration kann, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, durch die mittlere Signalintensität eines Antikörper-Peptid-Komplexes wiedergegeben werden. Daher wurde der Antikörper CB4-1 in fünf verschiedenen Konzentrationen (3.34 μ M, 667 nM, 66.7 nM, 6.67 nM und 667 pM) auf *Gnx* Mikroarrays inkubiert und die peptidassoziierten mittleren Signalintensitäten für alle Antikörperkonzentrationen gemessen (Versuchsaufbau siehe Abschnitt 4.1.2). Zur Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstante K_D wurde die mittlere Signalintensität für alle Antikörper-Peptid-Komplexe gegen die Antikörperkonzentration $[A]_i$ aufgetragen und die Datenpunkte durch nicht-lineare Regression an ein Modell angepasst, das den Zusammenhang zwischen SI und K_D beschreibt.

Das Modell basiert auf dem Massenwirkungsgesetz und wurde bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben (Gleichung 4.1-4.2). Unter der Annahme, dass $[A]_i \gg [P]$ ist, woraus $[A]_i - [AP] \approx [A]_i$ folgt, ergibt sich das in Gleichung 4.3 gezeigte Regressionsmodell, wobei $SI^{max} = \alpha \cdot [P]$ ist.

$$SI = \alpha \cdot [AP] + \beta = SI^{max} \cdot \frac{[A]_i}{K_D + [A]_i} + \beta \quad (4.3)$$

Für jedes der 26 Peptide wurden fünf Datenpunkte (fünf Antikörperkonzentrationen) erzeugt, deren Regression an das Modell sehr gute Korrelationen lieferten ($r^2=0.90-0.99$) (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Regressionskoeffizienten der durch Gleichung 4.3 gefitteten Daten für 26 Peptide bei fünf Antikörperkonzentrationen.

ID	Peptidsequenz	r^2	ID	Peptidsequenz	r^2
1	GATPQDLNTML	0.90	14	LELIQDLNQKLQDGF	0.99
2	EAWVLRGAMILWKTD	0.97	15	GATPEDLNQKLGN	0.95
3	EAWVLEGAMILWKTD	0.98	16	GLYEWGGARITNTD	0.99
4	TTMEWFRITDGARIM	0.99	17	RDFDKEWNLEIQNS	0.99
5	ITDGARIM	0.99	18	GATPEDLNQKL	0.95
6	DYFDLTQDNIIERRN	0.99	19	GLKEWGGARIT	0.99
7	DYFDLTQDNIITRRN	0.99	20	GATPEDLNAKL	0.93
8	DYFDLTQDNIITRRL	0.98	21	DATPEDLNAKL	0.97
9	LEMKQDLNIMLQDGF	0.99	22	DATPEDLNARL	0.99
10	LEMKQDLNPMLQDGF	0.98	23	DALPEWGGARI	0.99
11	LEMKQDLNQMLQDGF	0.99	24	DALYEWGGARI	0.99
12	LEMKQDLNIKLQDGF	0.99	25	FATPEDLNQKL	0.94
13	LEMKQDLNQLQDGF	0.98	26	FDKEWGGIRIT	0.99

Für vier der 26 Peptide sind die Kurven in Abbildung 4.6-A dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass für niedrigaffine Peptide ($pK_D=4.52$) die Datenpunkte nicht den linearen Bereich der sigmoiden Kurven abdecken. Folglich kann auch die Datenregression für diese Peptide fehlerbehaftet sein und falsche K_D -Werte liefern. Daraus resultiert, dass für eine verlässliche Datenregression und somit Bestimmung von K_D die verwendete Antikörperkonzentration höher als der größte K_D -Wert sein muss. Jedoch waren bei hohen Konzentrationen ($3.34 \mu\text{M}$) bereits Anzeichen unspezifischer Bindung zu erkennen (Abschnitt 4.1.2). Diese limitierenden Faktoren deuten darauf hin, dass mit Peptid-Mikroarrays ein maximaler K_D von $10 \mu\text{M}$ ($pK_D=5.0$) präzise bestimmt werden kann.

Ungeachtet dessen wurden die K_D -Werte für alle Peptide bestimmt und mit denen aus unabhängig davon durchgeführten SPR-Messungen verglichen. Der ermittelte K_D -Bereich erstreckt sich über vier Größenordnungen ($0.3 \mu\text{M}$ - 2 nM) ($pK_D=4.44$ - 8.69), was auch dem generellen Affinitätsbereich von Antikörper-Peptid-Komplexen entspricht [108]. Die Korrelationsanalyse (Abb. 4.6-B) der durch Peptid-Mikroarrays vorhergesagten und durch SPR-Messungen bestimmten Bindungsdissoziationskonstanten (hier dargestellt als pK_D) ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2=0.70$, wobei die Summe der quadratischen Abweichungen der vorhergesagten von den erwarteten pK_D -Werten maximal 7% betrug.

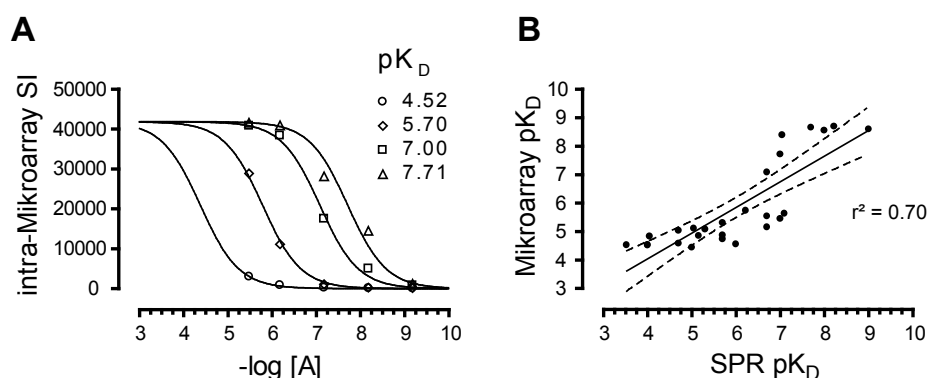


Abbildung 4.6: Quantitative Bestimmung von Affinität mit Peptid-Mikroarrays. **A:** Peptidassoziierte Signalintensitäten wurden gegen die verwendete Antikörperkonzentration $[A]$ aufgetragen. Die Kurven für vier Beispielpptide sind gezeigt. Die Regression der Datenpunkte erfolgte durch globale Beschränkung der Parameter SI^{max} und β . Für jedes Peptid wurde ein Wert für pK_D ermittelt. **B:** Die vorhergesagten pK_D -Werte wurden gegen die durch SPR-Messungen bestimmten pK_D -Werte aufgetragen und durch lineare Regression verglichen. Ein Korrelationskoeffizient von $r^2=0.70$ wurde ermittelt. Gestrichelte Linien repräsentieren die oberen und unteren 95% des Konfidenzintervalls der Regressionsgeraden. Entnommen aus Tapia und Bongartz et al. [147].

Die Bindungsdissoziationskonstante für einen Antikörper-Peptid-Komplex kann noch nicht mit sehr hoher Zuverlässigkeit bestimmt werden. Mögliche Gründe dafür werden in Abschnitt 4.4 diskutiert. Inwieweit die Mikroarraytechnologie für qualitative Bindungsstudien geeignet ist, soll im folgenden Abschnitt gezeigt werden.

4.1.5 Qualitative Bestimmung von Affinität mittels Peptid-Mikroarrays

Ein Hauptanwendungsgebiet von Peptid- und Protein-Mikroarrays ist die Identifizierung von Bindungspartnern, z.B. bei der Suche nach Enzymsubstraten oder Antikörperepitopen. Das Ziel einer solchen qualitativen Anwendung ist, die immobilisierte Probe (z.B. Peptid) als *Binder* oder *Nichtbinder* eines Analyten (z.B. Antikörper) zu identifizieren. Wie zuverlässig eine solche Aussage getroffen werden kann, wird in diesem Abschnitt untersucht.

Zunächst musste dazu ein Kriterium gefunden werden, das die untersuchten Peptide in ihre Klasse, *Binder* oder *Nichtbinder*, einteilt. Die Affinität, die die Grenze zwischen diesen beiden Klassen markiert, wird im Folgenden als pK_D^G bezeichnet. Anschließend wurde die Rate der korrekt klassifizierten Peptide (Vorhersagegenauigkeit) bestimmt.

Ein Kriterium, das die Klassenzugehörigkeit bestimmt, ist der p-Wert. Der p-Wert ist ein von der Mikroarrayanalysesoftware Genespotter (MicroDiscovery GmbH) bereitgestellter Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass das Spotsignal sich vom Hintergrundsignal unterscheidet (für eine detaillierte Beschreibung siehe Genespotter Hilfe-Funktion). Alle Spots, die einen p-Wert kleiner als 0.001 aufweisen, werden als *Binder* und alle Übrigen als *Nichtbinder*, die in Abb. 4.7-A durch den grauen Bereich graphisch veranschaulicht werden, definiert.

Die Sensitivität (Richtigpositivrate), die Spezifität (Richtignegativrate) und die Genauigkeit der Vorhersage der Klassenzugehörigkeit wurden bestimmt (Gleichungen 4.4 - 4.6), wobei rp und rn die Anzahl der Peptide angeben, die korrekt als *Binder* oder *Nichtbinder* und fp und fn die Anzahl der Peptide angeben, die falsch als *Binder* oder *Nichtbinder* klassifiziert wurden. Dabei wurde die Affinitätsgrenze pK_D^G in kleinen Schritten über die gesamten Affinitätsbereich hinweg verschoben (vertikale Linie in Abb. 4.7-A), und der pK_D^G -Wert bestimmt, der die größte Vorhersagegenauigkeit lieferte.

$$\text{Sensitivität} = \frac{rp}{rp + fn} \quad (4.4)$$

$$\text{Spezifität} = \frac{rn}{fp + rn} \quad (4.5)$$

$$\text{Vorhersagegenauigkeit} = \frac{rp + rn}{rp + rn + fp + fn} \quad (4.6)$$

Die in Abb. 4.7-A gezeigten Daten wurden bei einer Antikörperkonzentration von 667 nM gemessen. Es ist zu beachten, dass es sich hierbei nicht um gemittelte Signalintensitäten handelt, sondern dass jeder Spot für die Vorhersage in Betracht gezogen wurde. Die erhaltenen großen Vorhersagegenauigkeiten sind hier durch eine ROC-Kurve bei einer Antikörperkonzentration von 667 nM und einem pK_D^G -Wert von 6.2 veranschaulicht (Abb. 4.7-B). Die Größe der Fläche unter der Kurve (AuC) beträgt 0.98.

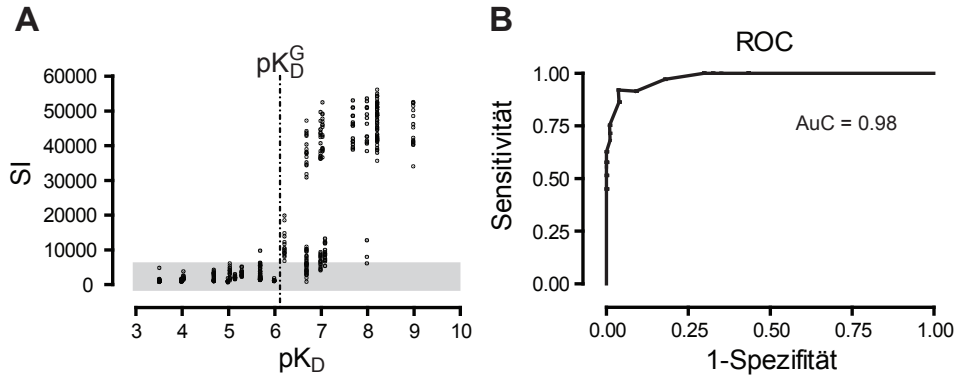


Abbildung 4.7: Qualitative Bestimmung von Affinität mit Peptid-Mikroarrays. **A:** Peptidassoziierte Signalintensitäten, gemessen für einzelnen Peptidspots bei einer Antikörperkonzentration von 667 nM sind gegen die Dissoziationskonstante aufgetragen. Die Peptide wurden anhand des p-Wert-Kriteriums in die Affinitätsklassen *Binder* und *Nichtbinder* eingeteilt. Der graue Bereich dient der graphischen Veranschaulichung der Grenze zwischen den Affinitätsklassen. Die Affinitätsgrenze pK_D^G (vertikale Linie), die die größte Vorhersagegenauigkeit der Affinitätsklassen lieferte, wurde bestimmt. **B:** ROC-Kurve bei einer Antikörperkonzentration von 667 nM und einem pK_D^G -Wert von 6.2, $AuC = 0.98$.

In Tabelle 4.4 sind die Sensitivität, die Spezifität sowie die Genauigkeit der Vorhersage der Affinitätsklassen mit den dazugehörigen pK_D^G -Werten für $p < 0.001$ bei allen verwendeten Antikörperkonzentrationen dargestellt.

Die Vorhersagegenauigkeit ist hoch bis sehr hoch und beträgt im Mittel 91%. Die Affinitätsgrenzen pK_D^G liegen für kleine Antikörperkonzentrationen bei $pK_D^G = 7$, verändert sich jedoch mit größer werdender Antikörperkonzentrationen hin zu $pK_D^G = 5$.

Tabelle 4.4: Vorhersagegenauigkeit der Bestimmung von Affinitätsklassen mit dem p-Wert-Kriterium. Die Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit der Affinitätsklassenvorhersage bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen sind gezeigt. pK_D^G gibt die jeweilige Affinitätsgrenze an.

[A] (M)	pK_D^G	Genauigkeit (%)	Sensitivität	Spezifität
6.67e-10	7	94	0.89	0.96
6.67e-09	7	90	0.88	0.91
6.67e-08	7	91	0.89	0.91
6.67e-07	6.0-6.2	94	0.92	0.96
3.34e-06	5	88	0.90	0.81

Ein weiteres Kriterium, das die Klassenzugehörigkeit bestimmt, wurde bereits zur Bestimmung der Vorhersagegenauigkeit der Klassenzugehörigkeit bei Peptid-Makroarrays, also auf Zellulosemembranen immobilisierten Peptiden, verwendet [163]. Hierbei wurde der Mittelwert der Hintergrund-Signalintensität plus dessen dreifache Standardabweichung als Grenze für die Klassenzugehörigkeit, *Binder* oder *Nichtbinder*, definiert.

Diese Methode wurde auch für die Mikroarray-Technologie angewendet. Ein Maß dafür, dass ein Bindungssignal sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet, ist das Signal-Rausch-Verhältnis (*engl.* Signal-to-Noise-Ratio, SNR) (Definition siehe Abschnitt 3.15.1). Je größer dieses Verhältnis ist, desto leichter ist es, Informationen zu extrahieren, und desto zuverlässiger sind die Ergebnisse. Die Grenze, die einen *Binder* von einem *Nichtbinder* unterscheidet, wurde als $\text{SNR} \geq 3$ definiert. Diese Grenze entspricht genau dem von *Weiser et al.* verwendeten Kriterium [163]. Die Vorhersagegenauigkeiten und die Affinitätsgrenzen pK_D^G wurden für das SNR-Kriterium bestimmt (Tabelle 4.5) und lieferte vergleichbare Resultate wie für das p-Wert-Kriterium.

Tabelle 4.5: Vorhersagegenauigkeit der Bestimmung von Affinitätsklassen mit dem $\text{SNR} > 3$ -Kriterium. Die Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit der Affinitätsklassenvorhersage bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen sind gezeigt. pK_D^G gibt die jeweilige Affinitätsgrenze an.

[A] (M)	pK_D^G	Genauigkeit (%)	Sensitivität	Spezifität
6.67e-10	7	92	0.95	0.91
6.67e-09	7	91	0.99	0.88
6.67e-08	7	88	0.96	0.85
6.67e-07	6	92	0.88	0.96
3.34e-06	6	81	0.86	0.79

4.2 Analyse von Serumantikörperbindungsprofilen auf Zufallspeptidbibliotheken

4.2.1 Technologische und experimentelle Einflussfaktoren

Die Messung von Serumantikörperbindungsprofilen mit Peptid-Mikroarrays ist einer Reihe technologischer und experimenteller Einflussfaktoren unterworfen. In Abb. 4.8 ist der prinzipielle Versuchsaufbau eines Mikroarrayexperiments dargestellt.

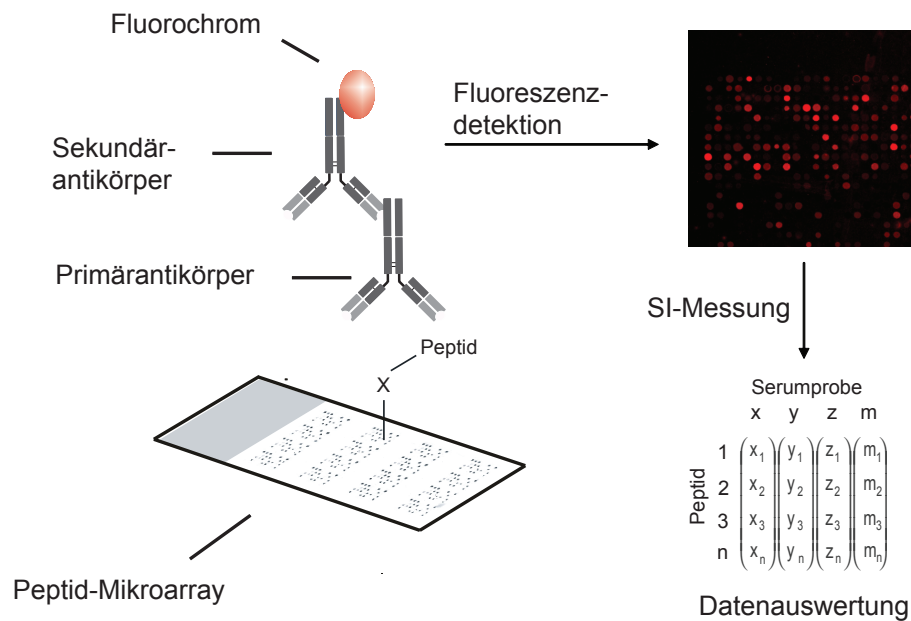


Abbildung 4.8: Messung von Serumantikörper-Peptid-Interaktionen mit Peptid-Mikroarrays: Versuchsaufbau. Ein mit Peptiden bedruckter Glasträger (Peptid-Mikroarray) wird mit einer Serumprobe inkubiert. Serumantikörper binden an Peptide was durch einen gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichteten fluorchrommarkierten Sekundärantikörper detektiert wird. Fluoreszenzsignale werden mit Hilfe eines Mikroarrayscanners ausgelesen und die Signalintensität jedes Peptidspots mit einer Analysesoftware bestimmt. Die resultierenden Signalintensitäten, die eindeutig den Peptiden auf dem Mikroarray, sowie der inkubierten Probe zugeordnet werden, dienen als Grundlage der Datenanalyse.

Auf einem mit Peptiden bedruckten Glasträger wird eine biologische Probe inkubiert. Bereits der Peptid-Mikroarray kann eine Quelle technologischer Varianz sein (siehe Abschnitt 4.1.1). Des Weiteren kann die biologische Probe je nach Art, Herkunft und Qualität starken Schwankungen unterworfen sein. Die Detektion einer Peptid-Antikörper-Bindung erfolgt durch einen fluorchrommarkierten antikörperisotypspezifischen Sekundärantikörper. Das hervorgerufene Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe eines Mikroarrayscanners ausgelesen. Die technologischen Möglichkeiten des verwendeten Mikroarrayscanners ermöglicht die gleichzeitige Detektion zweier unterschiedlich markierter Sekundärantikörper.

Die sich hier stellenden Fragen sind zum einen, welchen Anteil unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an der gemessenen Signalintensität hat, und zum anderen, ob die gleichzeitige Bindungsmessung von zwei verschiedenen Sekundärantikörpern verlässlich ist oder Mischungseinflüssen ausgesetzt ist. Auch die Wahl des Fluorochroms sowie die Scannereinstellungen bei der Fluoreszenzdetektion haben Auswirkungen auf die gemessene Signalintensität. Ferner entscheiden bei der eigentlichen Bestimmung der Signalintensität jedes Spots, die Einstellungen der Analysesoftware, welche Signalintensitätsdaten für die weitere Datenanalyse zur Verfügung stehen.

Auf die Standardisierung der Methode zur Messung von Serumantikörperbindungsprofilen wurde in dieser Arbeit besonderen Wert gelegt. Daher wurden alle aufgezählten Einflussfaktoren genauer untersucht. Die Ergebnisse dieser technologischen Studie werden in den folgenden Abschnitten dargestellt und diskutiert.

Peptidbibliotheken

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Peptidbibliotheken für die Antikörperbindungsstudien verwendet (Beschreibung siehe Abschnitt 3.12). Die quantitativen Bindungsstudien (Abschnitt 4.1) erforderten den Gebrauch einer Antigenbibliothek. Die betrachteten Antigen-Antikörper-Interaktionen sind sehr spezifisch, d.h. der Anteil unspezifischer Bindung ist vernachlässigbar klein, was sich auch in einem großen mittleren Signal-Rausch-Verhältnis ($SNR = 55.1$) niederschlägt.

Für die in den Kapiteln 4.3 und 5 gezeigten Anwendungen waren keine Antigene bekannt. Dementsprechend wurde auf Zufallspeptidbibliotheken zurückgegriffen. Im Vergleich zu Antigen-Peptiden, ist die Bindung eines Antikörpers an Peptide mit zufälliger Aminosäurezusammensetzung wesentlich schwächer ($SNR = 1.6 - 6.1$) und demzufolge einer größeren Variabilität unterworfen.

Eine Fehlerquelle, die sich vor allem in Zufallsbibliotheken bemerkbar machen könnte, sind Cystein-haltige Peptide. Da freie Thiolgruppen zur Bildung von Disulfidbrücken neigen, würden die u.U. zu Dimeren verknüpften Peptide aufgrund einer veränderten Konformation andere Bindungseigenschaften aufweisen als ihre monomer vorliegenden Pendanten. Wie bereits in Vorarbeiten gezeigt wurde [22], hat der Austausch von Cystein durch die Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin keinen Einfluss auf die Reaktivität des Peptids. Daher wurde wegen der besseren Synthetisierbarkeit und Handhabbarkeit der Peptide und der größeren Stabilität der Mikroarrays auf den Einbau von Cystein in die Zufallsbibliothek verzichtet.

Außerdem wurden Schwankungen der Signalintensität innerhalb einiger Mikroarrays, die mit der Zufallsbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ bedruckt waren, offensichtlich. Diese Schwankungen bestanden in der systematischen Abnahme der Signalintensität innerhalb jedes Unterblockes des Mikroarrays (Abb. 4.9).

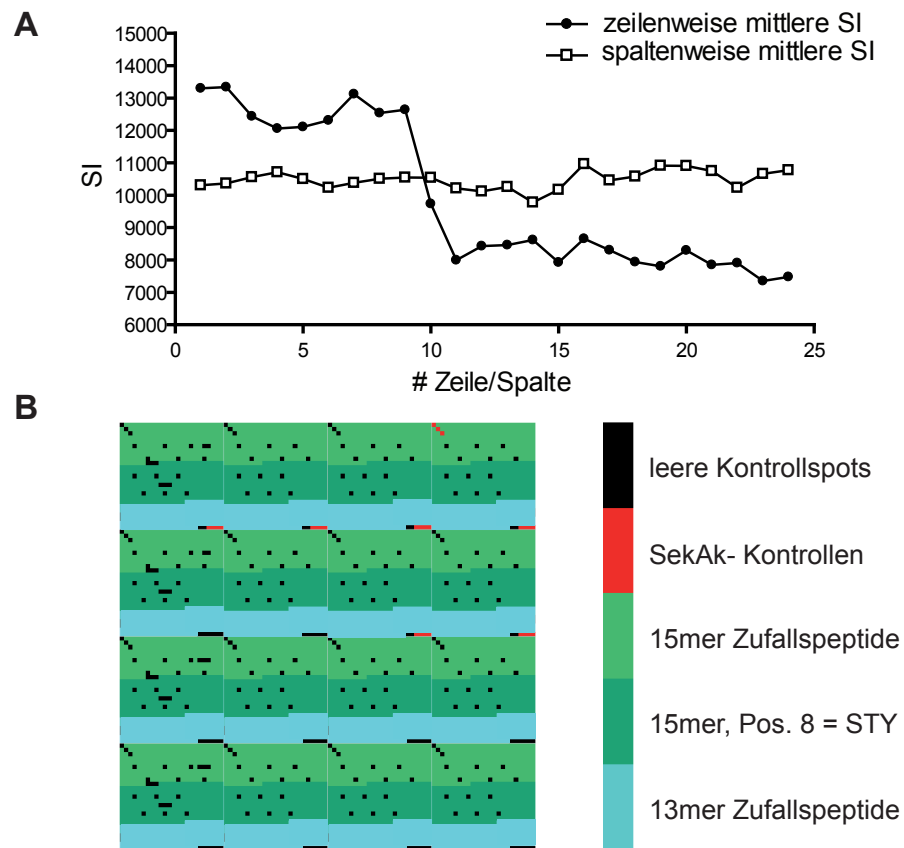


Abbildung 4.9: Einfluss verschiedener Peptidbibliotheken auf die Signalintensität. **A:** Reihen- bzw. spaltenweise mittlere Signalintensität eines Mikroarrays, der mit Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ bedruckt ist. Bei Zeile 10, der Grenze zweier Peptidsubbibliotheken kommt es zu einer sprunghaften Abnahme der Signalintensität. **B:** Anordnung verschiedener Peptidsubbibliotheken für einen der drei identischen Blöcke eines Mikroarrays, der mit Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ bedruckt ist (Bild generiert und zur Verfügung gestellt von André Dautcourt).

Im Zuge einer genaueren Untersuchung dieser Signalab- und -zunahme wurde festgestellt, dass diese exakt mit der Anordnung verschiedener Sub-Bibliotheken auf dem Mikroarray korreliert. Wie bereits in Abschnitt 3.12 beschrieben, besteht die Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ sowohl aus 13mer als auch aus 15mer Peptiden. Die 15mer Peptide unterteilen sich wiederum in solche, die aus reinen Zufallssequenzen bestehen, und solche, die an Position acht in der Sequenz ein Serin (S), Threonin (T) oder Tyrosin (Y) enthalten. Die Anordnung der unterschiedlichen Sub-Bibliotheken ist für Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ in Abb. 4.9-B für einen der drei identischen Blöcke eines Mikroarrays dargestellt.

Wie aus Abb. 4.9-A ersichtlich, nimmt die Signalintensität reihenweise nur sehr leicht, aber kontinuierlich ab, was tatsächlich auf den langen Druckprozess zurückzuführen wäre. Ab Reihe 10, der Reihe, die die Grenze zwischen zwei Sub-Bibliotheken markiert, kommt es zu einer sprunghaften Abnahme der Signalintensität. Ein funktioneller Zusammenhang

dieses Signalverlustes wurde ausgeschlossen, da auch 15mer Peptide aus den Reihen 1-9, die zufällig an Position acht ein S, T oder Y enthielten keine signifikant kleinere Signalintensität aufwiesen als die übrigen 15mer Peptide der Reihen 1-9. Außerdem bleiben die mittleren Signalintensitäten entlang der Spalten nahezu konstant. Aus Gründen der Vereinheitlichung wurden für die weiteren Analysen nur die Signale verwendet, die von den 15mer Zufallspeptiden stammen.

Blockierung freier Bindungsstellen

Um unspezifische Bindung der Antikörper an die Mikroarrayoberfläche zu verhindern, werden freie Bindungsstellen im ersten Schritt einer Inkubation blockiert. Dies erfolgt in der Regel mit einer Lösung eines für Antikörper nicht erkennbaren Proteins, wie z.B. Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin).

In diesem Abschnitt wird die Effektivität des Blockierens mit BSA und der Einfluss auf die Signalintensität, das Hintergrundsignal und die Reproduzierbarkeit untersucht. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Reaktivität des Sekundärantikörpers gelegt. Ziel war es vor allem dessen unspezifische Bindung an die Mikroarrayoberfläche zu verringern und somit die Anzahl der falschpositiven Signale zu minimieren.

Als Testsystem wurden die Sekundärantikörper anti-Maus-IgG2b-A647 (A647: Alexa Fluor 647) und anti-Maus-IgG2c-A546 (A546: Alexa Fluor 546) betrachtet. Diese Sekundärantikörper finden Verwendung bei der Analyse der Autoantikörperrepertoires von gesunden und autoimmunen Mäusen (Abschnitt 5.2). Die Inkubation erfolgte mit Mikroarrays, die mit der Peptidbibliothek P_{14+}^{300} bedruckt sind. Bei diesem Mikroarraytyp wurden freie Bindungsstellen bereits während der Herstellung mit BSA blockiert. Um ausschließlich das Bindungsverhalten dieser Sekundärantikörper zu untersuchen, wurden die Mikroarrays ohne vorangegangene Inkubation mit einer Serumprobe (Blank-Inkubation), jeweils mit anti-Maus-IgG2b und anti-Maus-IgG2c, mit und ohne vorheriger Blockierung mit BSA, in jeweils zwei Wiederholungsmessungen inkubiert.

Nach Blockierung verringert sich die Hintergrundsignalintensität signifikant für anti-Maus-IgG2c, erhöht sich jedoch leicht aber signifikant für anti-Maus-IgG2b (Abb. 4.10-B). Gleichzeitig verringert sich für anti-Maus-IgG2c die Signalintensität, während diese für anti-Maus-IgG2b annähernd konstant bleibt (Abb. 4.10-A). Insgesamt hat die Blockierung keinen signifikanten Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis für beide Sekundärantikörper (Abb. 4.10-C). Die Signifikanzwerte p wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet und sind in Tabelle 4.6 gezeigt.

Des Weiteren wurde der Anteil der falschpositiven Signale, also die Anzahl der Peptide, die vom Sekundärantikörper gebunden wurden, analysiert. Ein Peptid wird als „erkannt“ definiert, wenn sich die peptidassoziierte Signalintensität signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Diese Grenze wurde bei einem Signal-Rausch-Verhältnis $SNR > 3$ festgelegt (siehe Abschnitt 4.1.5) und die Anzahl der Peptide, die dieses Kriterium erfüllen, bestimmt.

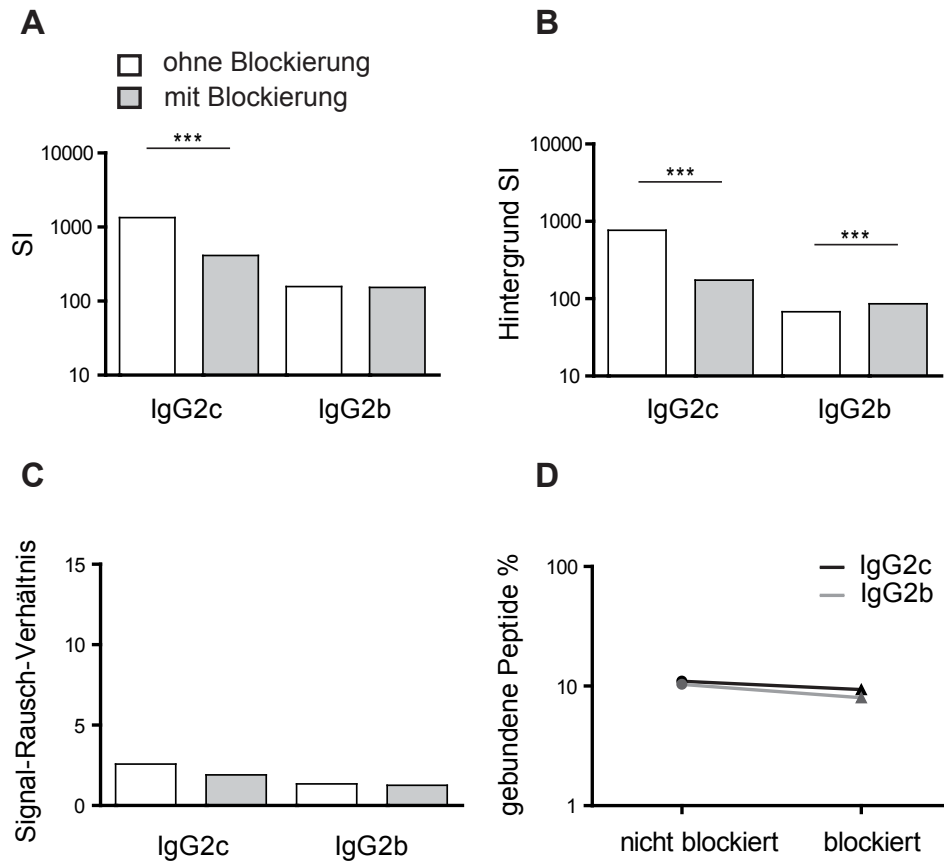


Abbildung 4.10: Einfluss von Blockierung mit BSA auf die Signalintensität. **A:** Signalintensität, gemessen nach Blank-Inkubation für anti-IgG2b und anti-IgG2c mit und ohne vorherigen Blockierungsschritt. Die Signalintensität für anti-IgG2c verringert sich signifikant. **B:** Hintergrundsignalintensität, gemessen nach Blank-Inkubation für anti-IgG2b und anti-IgG2c mit und ohne vorherigen Blockierungsschritt. Für anti-IgG2c verringert, für anti-IgG2b erhöht sich die Hintergrundsignalintensität signifikant. **C:** Das Signal-Rausch-Verhältnis ändert sich für anti-IgG2b und anti-IgG2c nicht signifikant mit und ohne Blockierungsschritt. **D:** Peptide mit $SNR > 3$ werden als, vom Sekundärantikörper falschpositiv erkannt, definiert. Der Anteil falsch gebundener Peptide durch die Sekundärantikörper verringert sich nach Blockierung geringfügig um jeweils 2%. Die Signifikanzwerte wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet. *** repräsentieren einen Signifikanzwert von $p < 0.001$.

Der Anteil der von anti-Maus-IgG2b falsch gebundenen Peptide ändert sich nur geringfügig von 11% ohne Blockierung auf 9% mit Blockierung. Anti-Maus-IgG2c bindet ohne Blockierung 10% der Peptide auf dem Mikroarray falsch, während mit Blockierung der Anteil ebenfalls leicht, auf 8%, gesenkt wird (Abb. 4.10-D).

Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und Verringerung unspezifischer Bindung aufgrund des zusätzlichen Blockierungsschrittes konnte für anti-Maus-IgG2b und -IgG2c nicht festgestellt werden.

Tabelle 4.6: Einfluss von Blockierung auf die Signalintensität. Die Signifikanzwerte p für die Änderung der Signalintensität, Hintergrundsignalintensität und des Signal-Rausch-Verhältnisses gemessen nach Blank-Inkubation für anti-IgG2b und anti-IgG2c mit und ohne vorherigen Blockierungsschritt. Die Signifikanzwerte wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

	Signifikanzwerte p	
	anti-Maus-IgG2c	anti-Maus-IgG2b
SI	0.0002	0.86
Hintergrund SI	< 0.0001	< 0.0001
SNR	0.43	0.82

Serumkonzentration

Die für Serumantikörperbindungsstudien geeignete Serumkonzentration wurde in einer Konzentrationsreihe bestimmt. Ein humanes Kontrollserum wurde in acht verschiedenen Verdünnungen (1:5–1:10000) auf jeweils einem Mikroarray inkubiert. Das entspricht einem Konzentrationsbereich von etwa 150 ng/ml–0.3 mg/ml für IgM und etwa 1.5 μ g/ml–3 mg/ml für IgG. Außerdem wurde eine Blank-Inkubation, in der statt Serum nur Verdünnungspuffer inkubiert wurde, als Kontrolle durchgeführt. Die IgM- und IgG-Bindungssignale und die Hintergrundsignale wurden gemessen und die Datenvarianz bestimmt (Tabelle 4.7). Die mittlere Blank-Signalintensität, die dem technologischen Hintergrundrauschen entspricht, wurde hierbei als Nulllinie definiert.

Tabelle 4.7: Serumverdünnung. Die für Mikroarray-Bindungsstudien geeignete Serumverdünnung wurde für IgG- und IgM- Bindungssignale bestimmt. Die mittlere Signalintensität und das Signal-Rausch-Verhältnis wurden für alle Verdünnungen und die Blank-Inkubation bestimmt.

Verdünnung	IgG		IgM	
	SI	SNR	SI	SNR
1:5	15340	0.10	4778	1.03
1:10	17832	0.18	3882	1.76
1:50	13506	1.16	1640	1.54
1:100	5421	1.42	1222	1.90
1:500	2958	1.29	512	1.97
1:1000	3162	1.95	512	3.08
1:5000	2408	1.72	248	1.90
1:10000	1802	1.86	246	2.32
Blank	2335	1.95	304	2.31

Erst ab einer Serumverdünnung von 1:500 hebt sich das Bindungssignal, sowohl für IgG als auch für IgM, signifikant vom Blank-Signal ab. Bei höheren Konzentrationen erhöht sich die Signalintensität deutlich, aber auch das Hintergrundsignal wächst mit zunehmender Antikörperkonzentration. Besonders für IgG nimmt das Signal-Rausch-Verhältnis mit zunehmender Konzentration (ab einer Verdünnung von 1:10) stark ab.

Für IgM steigt das Hintergrundsignal bei der gleichen Verdünnung nicht so stark an.

Demzufolge wurden, je nachdem welcher Antikörperisotyp betrachtet wurde, verschiedene Serumverdünnungen als geeignet bestimmt. Die ideale Serumverdünnung für IgG-Bindungsmessungen beträgt 1:100, für IgM-Bindungsmessungen 1:10. Bei der gleichzeitigen Messung von IgG- und IgM-Bindungssignalen sollte die Serumverdünnung nicht kleiner als 1:50 sein, da das durch unspezifische IgG-Bindung hervorgerufene Hintergrundrauschen sonst zu groß wird und die Bindungssignale nicht mehr auswertbar sind. Andererseits sollte die Verdünnung auch nicht größer als 1:500 sein, da die IgM-Signale dann zu schwach werden und ebenfalls nicht mehr auswertbar sind.

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit sich verschiedene Antikörperkonzentrationen auf die Signalintensität auswirken. Diese Fragestellung ist vor allem für die Messung von Serumantikörperbindungsprofilen zur Diagnose von Immunitätszuständen (Kapitel 5) interessant, da für diese Anwendung kleinste Antikörperkonzentrationsunterschiede detektiert werden müssen. Daher wurden die Korrelationen der Signalintensitäten, gemessen bei einer Serumverdünnung mit den Signalintensitäten, gemessen bei allen anderen Serumverdünnungen, analysiert. Die Korrelationsanalyse belegt, dass kleine Konzentrationsunterschiede (bis 10fach) sich nicht oder nur wenig auf die gemessenen Signalintensitäten auswirken ($r_{IgM}^2 = 0.81, (0.43 - 0.91)$; $r_{IgG}^2 = 0.74, (0.34 - 0.88)$). Dabei ist zu beachten, dass die Signalintensitäten bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen weniger gut korrelieren, da diese häufig Anteile unspezifischer Bindung enthalten. Zum Vergleich rufen größere Antikörperkonzentrationsunterschiede (größer als 10fach) deutlich schlechtere Korrelationen der Signalintensitäten hervor ($r_{IgM}^2 = 0.24, (0.11 - 0.77)$; $r_{IgG}^2 = 0.46, (0.03 - 0.81)$).

Sekundärantikörperkonzentration

Um die geeignete Sekundärantikörperkonzentration zu bestimmen, wurde ein humanes Kontrollserum in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert und die IgG- und IgM-Bindungssignale bei fünf verschiedenen anti-IgG und anti-IgM Sekundärantikörperkonzentrationen (1-20 $\mu\text{g/ml}$) detektiert.

Tabelle 4.8: Sekundärantikörperkonzentration. Die für Mikroarray-Bindungsstudien geeignete Sekundärantikörperkonzentration wurde für anti-Human-IgG und anti-Human-IgM bei einer Serumverdünnung von 1:100 bestimmt. Die mittlere Signalintensität und das Signal-Rausch-Verhältnis wurden für alle eingesetzten Sekundärantikörperkonzentrationen bestimmt. Bei der Blank-Inkubation wurden die Sekundärantikörper in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	anti-IgM		anti-IgG	
	SI	SNR	SI	SNR
20	1427	1.69	8210	1.15
10	1325	2.27	5071	1.72
4	974	2.27	2780	2.06
2	934	1.95	2334	1.82
1	790	2.01	1261	1.70
Blank	304	2.31	2335	1.95

Die Signalintensität der IgM-Bindungssignale nimmt mit steigender Sekundärantikörperkonzentration zu. Bei einer anti-IgM Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ist das Signal-Rausch-Verhältnis maximal. Die Signalintensität der IgG-Bindungssignale nimmt ebenfalls mit steigender Sekundärantikörperkonzentration zu. Jedoch nimmt das Signal-Rausch-Verhältnis ab einer Sekundärantikörperkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ab. Für eine Serumverdünnung von 1:100 wurde demzufolge eine geeignete Sekundärantikörperkonzentration für IgG-Bindungsmessungen von 4 $\mu\text{g/ml}$ und für IgM-Bindungsmessungen von 10 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt.

Anteil des Sekundärantikörpers an der Bindungssignalintensität

Das gemessene Fluoreszenzsignal einer Antikörper-Peptid-Interaktion setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Zum einen kann die Eigenfluoreszenz der Peptide auf dem Mikroarray zum Gesamtsignal beitragen. Vor allem die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan weisen bei Anregung bei ca. 200-400 nm ein intrinsisches Fluoreszenzsignal auf [73]. Des Weiteren wird vermutet, dass die Sekundärantikörper einen großen Anteil an unspezifischen Fluoreszenzsignalen haben, da diese Reaktivität gegenüber der Peptidbibliothek aufweisen können. In diesem Abschnitt wird der Anteil, den die jeweiligen Faktoren am Gesamtfluoreszenzsignal haben, ermittelt und diskutiert.

Zur Bestimmung der intrinsischen Aminosäureseitenkettenfluoreszenz (IF) wurde ein Mikroarray ohne vorherige Behandlung bei den Anregungswellenlängen 532 nm und 635 nm gescannt. Der Anteil des Sekundärantikörpers an der gemessenen Signalintensität wurde durch Inkubation eines Mikroarrays mit den Sekundärantikörpern anti-Human-IgG-A546 (A546: Alexa Fluor 546) und anti-Human-IgM-A647 (A647: Alexa Fluor 647), ohne vorherige Behandlung mit einer Serumprobe (Blank), bestimmt. Das Gesamtsignal eines Mikroarrayexperiments wurde schließlich durch Inkubation einer humanen Serumprobe und Detektion mit den Sekundärantikörpern anti-Human-IgG-A546 und anti-Human-IgM-A647 ermittelt.

Abb. 4.11-A gibt die Signale nach Anregung von A546 bei 532 nm bzw. von A647 bei 635 nm wieder. Die bei den beiden Emissionswellenlängen (546 nm, 647 nm) jeweils gemessene Gesamtsignalintensität ist für die drei verschiedenen Messungen in Abb. 4.11-B dargestellt. Die Signalintensitäten der intrinsischen Fluoreszenzmessung bewegen sich nahe der Detektionsgrenze des Fluoreszenzscanners ($SI_{546} = 27$, $SI_{647} = 24$) und nur wenige Signale setzten sich deutlich vom Hintergrund ab (2.8% bei $SNR_{546} > 3$, 0.1% bei $SNR_{647} > 3$). Jedoch lassen sich bei diesen Signalen keine Abhängigkeiten von der Aminosäuresequenz feststellen. Lediglich Tryptophan zeigt eine leicht erhöhte Präsenz gegenüber der Verteilung auf dem gesamten Mikroarray. Statt der zufälligen Häufigkeit von Tryptophan von ca. 5% auf dem Mikroarray sind ca. 6.5% Tryptophan unter den Peptiden, die eine sich vom Hintergrund abhebende Signalintensität aufweisen. Da dieser Einfluss verschwindend gering ist, wird dieser Beitrag zur Gesamtsignalintensität im Folgenden vernachlässigt.

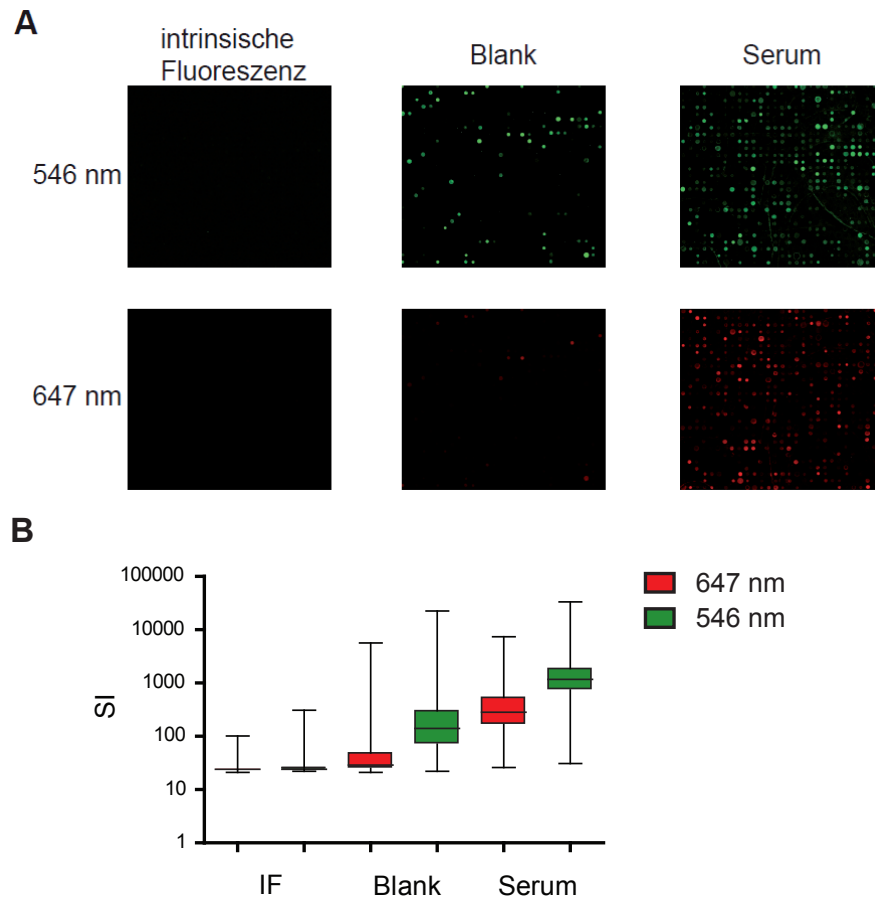


Abbildung 4.11: Beiträge zum Fluoreszenzsignal. **A:** Mikroarraybilder der intrinsischen Aminosäureseitenkettenfluoreszenz (IF), der Sekundärantikörperbindungssignale (Blank) und von Serumantikörper-Bindungssignalen (Serum) bei den Emissionswellenlängen 546 nm und 647 nm. **B:** Die über den gesamten Mikroarray gemittelte Signalintensität der intrinsischen Aminosäureseitenkettenfluoreszenz (IF), der Sekundärantikörperbindungssignale (Blank) und von Serumantikörper-Bindungssignalen (Serum), gemessen bei 546 nm und 647 nm.

Wesentlich deutlicher und daher nicht zu vernachlässigen sind die Signale, die die Sekundärantikörper hervorrufen (Abb. 4.11-B). Die mittlere Signalintensität hebt sich deutlich vom Hintergrundrauschen ab ($SI_{546} = 640$, $SI_{647} = 88$). Da es sich bei den untersuchten Sekundärantikörpern selbst um vollständige, funktionelle Antikörper handelt, können diese ebenfalls die Peptide auf dem Mikroarray binden. 18.6% (bei $SNR_{546} > 3$) der Peptide wurden von anti-Human-IgG-A546 bzw. 18.7% (bei $SNR_{647} > 3$) von anti-Human-IgM-A647 gebunden. Da diese Signale später nicht mehr von den „echten“ Serumantikörperbindungssignalen zu unterscheiden sind, wird aus den Resultaten dieser Untersuchung geschlossen, dass für jedes Mikroarrayexperiment immer auch der Anteil der Sekundärantikörper am Bindungssignal bestimmt werden muss, d.h. dass stets eine Inkubation der Sekundärantikörper ohne vorherige Behandlung mit einer Antikörperprobe durchzuführen ist. Dieser hier als *Blank* bezeichnete Datensatz kann später dazu verwendet

werden, die falsch-positiven Signale, die von unspezifischer Sekundärantikörperbindung herrühren, bei jeder Antikörperbindungsstudie zu entfernen. Die genaue Prozedur wird in Abschnitt 4.2.2 beschrieben.

Detektion mit Sekundärantikörpermischungen

Die technische Ausstattung des Mikroarrayscanners erlaubt die gleichzeitige Detektion von zwei verschiedenen Bindungssignalen bei den Emissionswellenlängen 546 nm und 647 nm. Bezogen auf die Messung von Antikörperbindungssignalen, ermöglicht das die gleichzeitige Bindungsdetektion verschiedener Antikörperisotypen z.B. IgG und IgM. Die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an den Antikörper-Isotyp, gegen den er hergestellt wurde, ist eine wichtige Voraussetzung, um isotypspezifische Bindungsprofile untersuchen zu können. Ist ein Sekundärantikörper kreuzreaktiv gegen andere Antikörperisotypen ist dessen Güte als gering einzuschätzen.

In diesem Abschnitt wird die Spezifität und Kreuzreaktivität von zwei verschiedenen Detektionssystemen untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um anti-Maus-IgG2b-A647 und anti-Maus-IgG2c-A546, die für die Untersuchung des Autoantikörperrepertoires von $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen (Abschnitt 5) verwendet werden. Zum anderen werden anti-Human-IgM-A647 und anti-Human-IgG-A647, die bei der Analyse von humanen Antikörperrepertoires (Abschnitt 5.3) Verwendung finden, auf Spezifität und Kreuzreaktivität hin untersucht. Die Analyse umfasst den Vergleich der Fluoreszenzsignale, die ein Sekundärantikörper allein und in Mischung mit dem jeweiligen zweiten Sekundärantikörper hervorruft.

Anti-Maus-IgG2b-A647 und anti-Maus-IgG2c-A546 wurden in einem Blank- Experiment, jeweils einzeln, in Mischung mit dem jeweils anderen unmarkierten Sekundärantikörper und in Mischung mit dem jeweils anderen fluorchrommarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Signalintensitäten wurden bei beiden Emissionswellenlängen für jeden der Versuche bestimmt und die Korrelation der Signalintensitäten untersucht. Die mittlere Signalintensität, die für die Einzel- und Mischinkubationen erhalten wurde, blieb nahezu konstant, sowohl für die Anti-Maus-IgG2b-A647- ($SI = 62; 69; 68$) als auch für die anti-Maus-IgG2c-A546- Signale ($SI = 340; 318; 366$) (Abb. 4.12-A). Im unteren Teil der Abb. 4.12-A wird außerdem dargestellt, dass kein Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten der beiden Sekundärantikörper durch den jeweils anderen Sekundärantikörper festzustellen ist ($r_{\alpha\text{-IgG2c}}^2 = 0.88 - 0.92$, $r_{\alpha\text{-IgG2b}}^2 = 0.90 - 0.92$). Folglich kann eine Kreuzreaktivität der beiden Sekundärantikörper gegen den jeweils anderen Antikörperisotyp ausgeschlossen werden und eine gleichzeitige Detektion von IgG2b und IgG2c ist mit den verwendeten Sekundärantikörpern uneingeschränkt zulässig.

Anti-Human-IgM-A647 und anti-Human-IgG-A546 wurden ebenfalls in einem Blank-Experiment, jeweils einzeln und in Mischung mit dem jeweils anderen fluorchrommarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Mischung mit unmarkiertem Sekundärantikörper konnte hier nicht durchgeführt werden, da anti-Human-IgM und anti-Human-IgG vom Hersteller ausschließlich fluorchrommarkiert geliefert wurden. Auch für dieses Detektions-

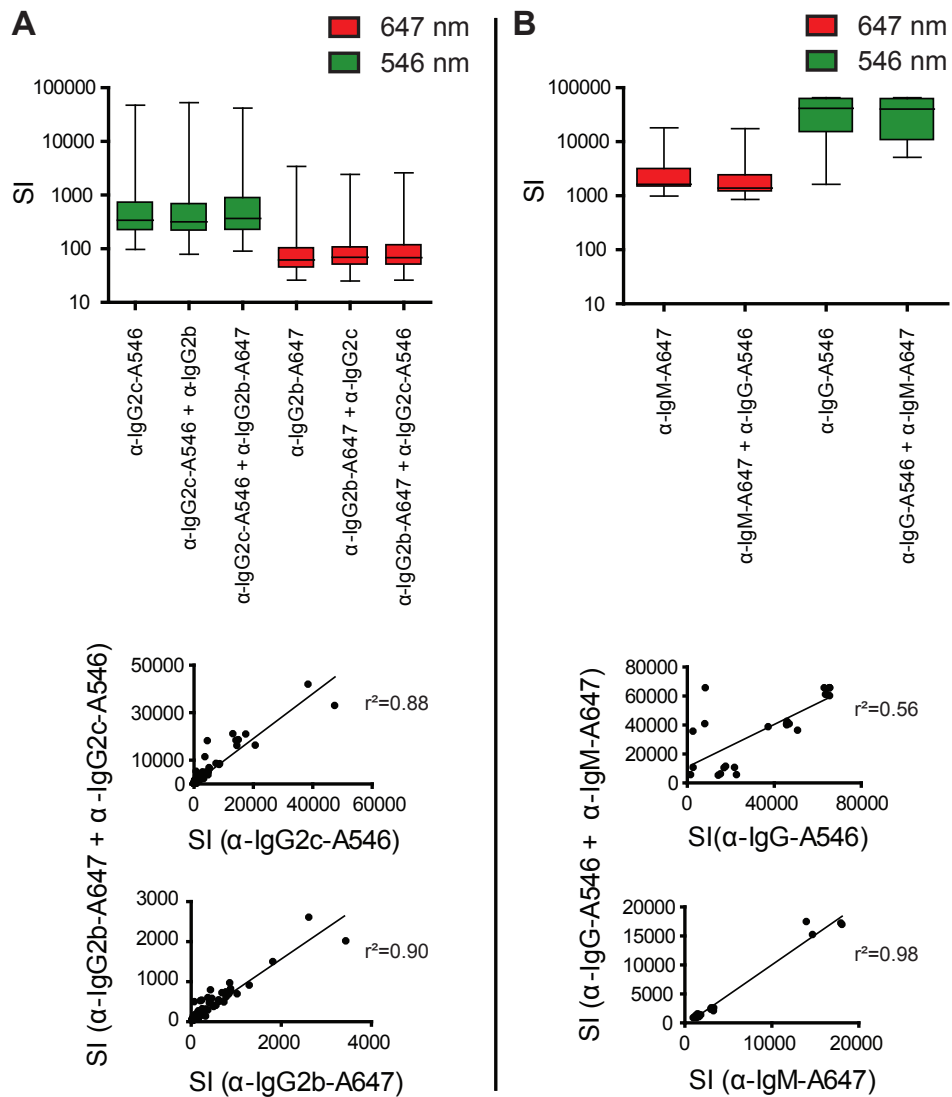


Abbildung 4.12: Einfluss von Sekundärantikörpermischungen auf die Signalintensität. **A:** Die über den gesamten Mikroarray gemittelten Signalintensitäten, ermittelt nach Blank-Inkubationen der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG2b-Alexa Fluor 647 und Anti-Maus-IgG2c-Alexa Fluor 546, jeweils einzeln, in Mischung mit dem jeweils anderen unmarkierten Sekundärantikörper und in Mischung mit dem jeweils anderen fluorochrommarkierten Sekundärantikörper, gemessen bei 546 nm und 647 nm. **B:** Die über den gesamten Mikroarray gemittelten Signalintensitäten, ermittelt nach Blank-Inkubationen der Sekundärantikörper Anti-Human-IgG-Alexa Fluor 546 und Anti-Human-IgM-Alexa Fluor 647, jeweils einzeln und in Mischung mit dem jeweils anderen fluorochrommarkierten Sekundärantikörper, gemessen bei 546 nm und 647 nm. Die Korrelation der Signalintensitäten zwischen einzelnen und in Mischung inkubierten Antikörpern sind dargestellt (untere Graphen).

system ändert sich die mittlere Signalintensität, die für die Einzel- und Mischinkubationen erhalten wurde, nur unwesentlich ($SI_{IgM} = 1629; 1385$, $SI_{IgG} = 41539; 40208$) (Abb. 4.12-B). Betrachtet man allerdings die Korrelation der Signalintensitäten aus Einzel- und Mischinkubation (Abb. 4.12-B unten), wird deutlich, dass die Signalintensitäten, gemessen mit anti-Human-IgG-A546 einzeln und in Mischung mit anti-Human-IgM-A647 nicht reproduzierbar sind ($r_{\alpha-IgG}^2 = 0.56$), während die Signalintensitäten, gemessen mit anti-Human-IgM-A647 auch in Mischung mit anti-Human-IgG-A546 sehr gut wiedergegeben werden ($r_{\alpha-IgM}^2 = 0.98$). Während anti-IgM ausschließlich IgM-Antikörper bindet, ist anti-IgG kreuzreaktiv gegen IgM-Antikörper.

4.2.2 Messung der Signalintensität und Datenoptimierung

Fluoreszenzdetektion und Bestimmung der Signalintensität

Für die folgende Untersuchung wurden drei Wiederholungsininkubationen von Serum einer gesunden BALB/c-Maus durchgeführt und die IgG- und IgM-Bindungssignale gemessen. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner. Die Auflösung wurde auf eine Pixelgröße der Kantenlänge $10\ \mu\text{m}$ festgelegt, was bei einem mittleren Spotdurchmesser von $100\ \mu\text{m}$ eine verlässliche Größenordnung darstellt. Die Laserleistung wurde auf 5% reduziert, da sonst das Hintergrundrauschen das tatsächliche Signal überstrahlen würde. Das Signal wird im Detektor 400-fach verstärkt. Eine noch größere Verstärkung kann bereits zu einer Signalsättigung führen. Diese Scannereinstellungen wurden für alle Studien beibehalten.

Die Signalintensität jedes Peptidspots wird bestimmt, indem auf das Mikroarraybild ein Koordinatengitter gelegt wird, so dass jedem Spot seine Position und Peptidsequenz zuordnet werden kann, und der Median der Pixelintensität innerhalb jedes Gitterkreises berechnet wird (Abb. 4.13-A). Die Hintergrundsignalintensität berechnet sich aus der mittleren Pixelintensität im Bereich des vierfachen Spotdurchmessers abzüglich eines Sicherheitsabstands von jeweils zwei Pixeln zu allen Spots (weiße Fläche in Abb. 4.13-A).

Diese Prozedur sollte möglichst unabhängig von den technologischen Gegebenheiten und dem Experimentator durchgeführt werden können, um einheitliche Ergebnisse zu erzielen. Daher müssen die geeigneten Parameter des Koordinatengitters definiert werden. Einer dieser Parameter ist der Spotdurchmesser, der unmittelbar zwei wichtige Messwerte, die Signalintensität und die Hintergrundsignalintensität, beeinflusst. Ist der Durchmesser der Gitterkreise größer ($100\ \mu\text{m}$) als der der Peptidspots, wird die mittlere Signalintensität als zu klein gemessen (ca. 11% verringerte SI), da zur Berechnung der Spotsignalintensität auch Teile des Hintergrundsignals einfließen (Abb. 4.13-B). Ist der Durchmesser der Gitterkreise kleiner ($50\ \mu\text{m}$) als der der Peptidspots, wird zwar mit großer Sicherheit ein realistischer Wert für die Signalintensität ermittelt, jedoch werden auch Teile des Spotsignals zur Messung des Hintergrundsignals berücksichtigt, wie in Abb. 4.13-C exemplarisch für die aus drei Wiederholungsmessungen mittleren IgM-Signale bei drei verschiedenen Spotdurchmessereinstellungen ($50\ \mu\text{m}$, $100\ \mu\text{m}$, variabel) gezeigt. Da die Spotgrößen variieren können, ist die beste Möglichkeit zu verlässlichen Ergebnissen für die Spotsignalintensität und die Hintergrundsignalintensität zu gelangen die, die automatische

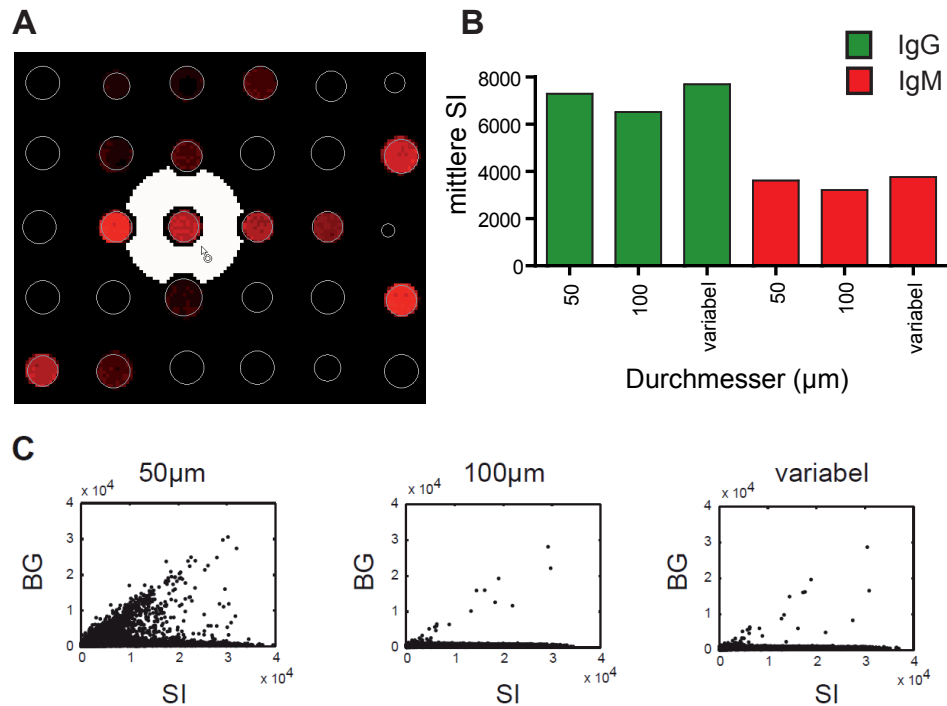


Abbildung 4.13: Einfluss der Bedingungen bei der Signalintensitätsbestimmung auf die Signalintensität. **A:** Zur Bestimmung der Signalintensität wird ein Koordinatengitter auf das Mikroarraybild gelegt. Die Signalintensität berechnet sich aus dem Median der Pixelintensität innerhalb jedes Gitterkreises. Die Hintergrundsignalintensität wird aus der mittleren Pixelintensität im Bereich des vierfachen Spotdurchmessers abzüglich eines Sicherheitsabstands von jeweils zwei Pixeln zu allen Spots (weiße Fläche) bestimmt. **B:** Für drei Wiederholungsinokubationen von Serum einer gesunden Balb/c-Maus wurden die Mittelwerte der IgG- und IgM-Bindungssignalintensitäten für verschiedene Koordinatengitterkreisdurchmesser (50 μm , 100 μm , variabel) bestimmt. **C:** Korrelation von Signalintensitäten und Hintergrundsignalintensitäten, gemessen mit verschiedenen Koordinatengitterkreisdurchmessern (50 μm , 100 μm , variabel).

Gittersuchfunktion der Auswertungssoftware zu nutzen, die auch den Durchmesser der Gitterkreise dynamisch anpasst (variabel). Dabei wurde der Bereich der Anpassung so beschränkt, dass der Kreisdurchmesser auf ein Minimum von 33% verkleinert und maximal um 100% des Ursprungsdurchmessers (100 μm) vergrößert werden kann.

Korrektur von falschpositiven Signalen

Falschpositive Signale entstehen aufgrund unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers an die Peptidbibliothek. Der Anteil dieser Signale ist, wie in Abschnitt 4.2.1 besprochen, nicht zu vernachlässigen. Zur Ermittlung der falschpositiven Signale wurden Blank-Inkubationen, d.h. die Inkubation von ausschließlich Sekundärantikörper, durchgeführt.

Ein Maß dafür, dass ein Bindungssignal sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet ist das Signal-Rausch-Verhältnis. In Abschnitt 4.1.5 wurde bereits dargelegt, dass $\text{SNR} > 3$ ein geeignetes Kriterium darstellt, um Binder und Nichtbinder zu unterscheiden [147, 163]. Ist

$SNR > 3$ wird dieses Signal als falschpositiv definiert. Als falschpositiv definierte Peptide wurden aus allen Datensätzen eliminiert und nicht für die weitere Analyse berücksichtigt.

4.2.3 Eigenschaften und Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten

Zur Untersuchung der Eigenschaften von Serumantikörperbindungsprofilen gegenüber Zufallspeptidbibliotheken wurde das Serumantikörperbindungsprofil eines humanen Kontrollserums eines gesunden Spenders in 7 identischen Wiederholungsinokubationen gemessen. Die Inkubation erfolgte auf mit Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ bedruckten Mikroarrays derselben Charge am selben Tag.

Eigenschaften

Die Verteilung der Signalintensitäten entspricht einer Lognormalverteilung (Abb. 4.14-A). Die Art der statistischen Datenverteilung wurde durch Gauss-Fit der logarithmierten Signalintensitäten ($\mu = 3.7$, $\sigma = 0.18$, $r^2 = 0.94$) und durch Vergleich gegen eine Standardnormalverteilung in einem Quantil-Quantil-Diagramm (Abb. 4.14-B) gezeigt.

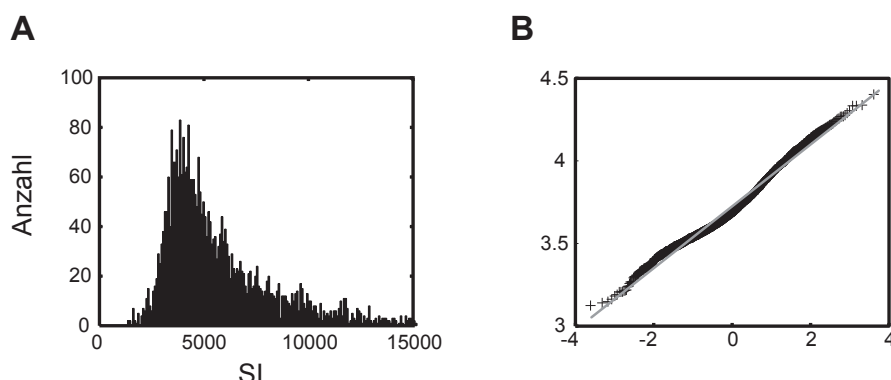


Abbildung 4.14: Signalintensitätsverteilung. **A:** Die Verteilung der IgM-Signalintensitäten von sieben Inkubationsrepetitionen des gleichen humanen Kontrollserums. **B:** Vergleich der logarithmierten IgM-Signalintensitäten gegen eine Standardnormalverteilung in einem Quantil-Quantil-Diagramm.

In Abb. 4.15 sind die über alle Wiederholungsmessungen gemittelten Signalintensitäten für alle Peptide, sortiert nach deren Größe gezeigt. Ein Signalintensitätsbereich von $SI = 1072$ bis $SI = 25345$ wird abgedeckt, wobei die Signalintensität im Mittel $SI = 4855$ beträgt. Die graue Fläche markiert die mittleren Signalintensität des lokalen Hintergrunds ($SI_{BG} = 3577$). Das Signal-Rausch-Verhältnis beträgt im Mittel $SNR = 1.66$ (-4.82 – 45.92). Etwa 64% der Signale rangieren oberhalb des lokalen Hintergrundes, jedoch setzen sich nur ca. 20% der Signale signifikant ($SNR > 3$) vom Hintergrund ab.

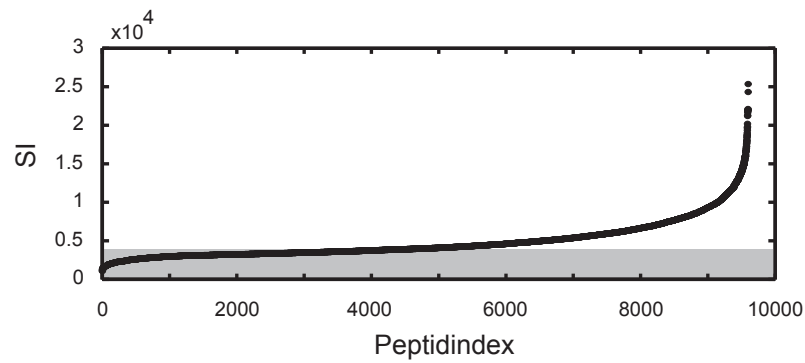


Abbildung 4.15: Messbarer Signalintensitätsbereich. Die IgM-Signalintensitäten von sieben Inkubationsrepetitionen eines humanen Kontrollserums wurden der Größe nach sortiert. Der graue Bereich markiert die mittlere lokale Hintergrundsignalintensität.

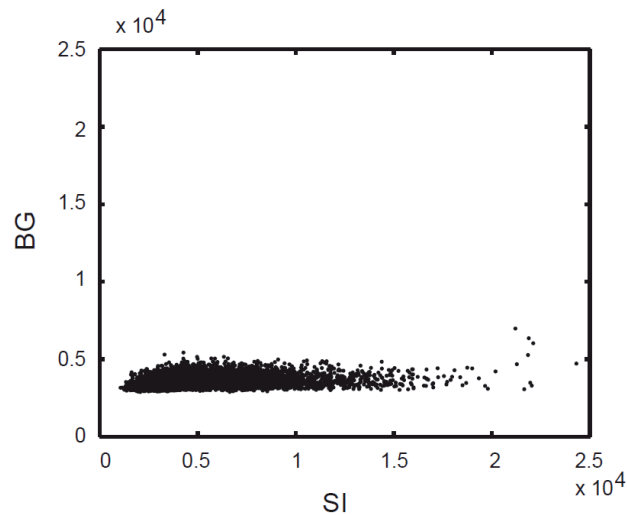


Abbildung 4.16: IgM-Signalintensität vs. Hintergrundsignalintensität jedes einzelnen Peptids von sieben Inkubationsrepetitionen des gleichen humanen Kontrollserums.

Der lokale Hintergrund ist unabhängig von der Signalintensität der Peptidspots und bleibt weitgehend konstant (Abb. 4.16). Der Variationskoeffizient beträgt 10.2%.

Reproduzierbarkeit

Wie in den Abschnitten 4.1.1 und 4.3.2 gezeigt wurde, ist die Reproduzierbarkeit von gemessenen Signalintensitäten, die aus der Interaktion eines monoklonalen Antikörpers mit verschiedenen Epitop-homologen Peptiden bzw. Zufallspeptiden resultieren, sehr hoch.

In diesem Abschnitt soll nun die Reproduzierbarkeit von Serumantikörper-Zufallspeptid-Bindungsmessungen untersucht werden. Dazu wurde ein humanes Kontrollserum eines ge-

sunden Spenders in 14 identischen Wiederholungen inkubiert und die IgM-Bindungssignale gemessen (siehe Abb. 4, Anhang B). Die Inkubationen wurden auf Mikroarrays derselben Charge (Chargennummer: 1089), die mit Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ (siehe Abschnitt 3.12) bedruckt sind, durchgeführt und erfolgten an drei verschiedenen Tagen (Tag 1: 4 Repetitionen, Tag 2: 7 Repetitionen, Tag 3: 3 Repetitionen). Abb. 4.17 zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der Signalintensität von 9182 Peptiden aus 14 repetitiven Inkubationen des humanen Kontrollserums. Daraus wird bereits ersichtlich, dass die technologische Variabilität von Signalintensitätsmessungen sehr klein ist.

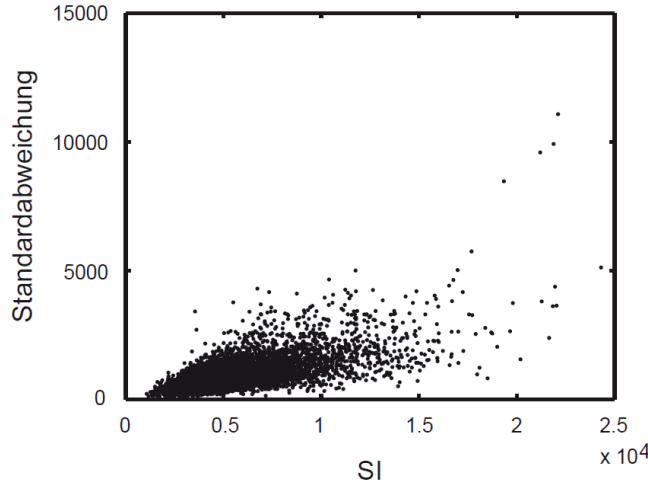


Abbildung 4.17: Mittelwert und die Standardabweichung der Signalintensität von 9182 Peptiden aus 14 repetitiven Inkubationen eines humanen Kontrollserums.

Da jedes der 9182 Peptide auf diesem Mikroarraytyp in drei Repetitionen vorkommt, konnte die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten innerhalb jedes Mikroarrays betrachtet werden. Die Korrelationskoeffizienten rangieren im Bereich $r^2 = 0.71 - 0.91$ und betragen im Mittel $r^2 = 0.84$.

Des Weiteren wurde die Korrelation von Signalintensitäten, die auf verschiedenen Mikroarrays derselben Charge gemessen wurden, untersucht. Tabelle 4.9 zeigt die Korrelationskoeffizienten für 14 Wiederholungsmessungen an drei verschiedenen Tagen. Innerhalb der Tage ist die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten sehr gut, was sich in den hohen mittleren Korrelationskoeffizienten widerspiegelt ($r_{Tag1}^2 = 0.93$, $r_{Tag2}^2 = 0.88$, $r_{Tag3}^2 = 0.87$). Aber auch zwischen den Tagen sind die Signalintensitäten gut reproduzierbar ($r_{inter-Tag}^2 = 0.85$).

Außerdem wurde untersucht, inwieweit Signalintensitäten, die auf Mikroarrays verschiedener Chargen gemessen wurden, reproduzierbar sind. Dazu wurden jeweils drei Mikroarrays aus drei Mikroarraychargen (Chargennummern: 1186, 1188, 1189) mit einem humanen Kontrollserum eines gesunden Spenders inkubiert und die IgM-Bindungssignale gemessen. Tabelle 4.10 zeigt die Korrelationskoeffizienten für neun Wiederholungsmessungen auf drei verschiedenen Mikroarraychargen. Innerhalb von Mikroarraychargen sind die

Tabelle 4.9: Reproduzierbarkeit von Signalintensitätsmessungen an verschiedenen Tagen. Die inter-Mikroarray Korrelationen der Signalintensitäten von 9182 Peptiden aus 14 repetitiven Inkubationen eines humanen Kontrollserums wurden bestimmt. Die Inkubationen wurden auf mit Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ bedruckten Mikroarrays derselben Charge durchgeführt und erfolgten an drei verschiedenen Tagen (Tag 1: vier Repetitionen, Tag 2: sieben Repetitionen, Tag 3: drei Repetitionen). Die Korrelationskoeffizienten, die aus Inkubationen desselben Tages resultieren, sind fett markiert.

Tag 1				Tag 2							Tag 3		
1.00	0.95	0.94	0.93	0.85	0.90	0.87	0.89	0.90	0.86	0.88	0.85	0.87	0.83
	1.00	0.94	0.91	0.84	0.87	0.87	0.87	0.89	0.85	0.86	0.85	0.85	0.82
		1.00	0.91	0.80	0.85	0.85	0.88	0.88	0.86	0.84	0.85	0.84	0.84
			1.00	0.81	0.87	0.86	0.87	0.89	0.83	0.86	0.80	0.84	0.79
				1.00	0.92	0.87	0.87	0.89	0.79	0.79	0.84	0.86	0.82
					1.00	0.92	0.94	0.92	0.86	0.85	0.86	0.89	0.85
						1.00	0.94	0.92	0.86	0.85	0.86	0.88	0.85
							1.00	0.94	0.89	0.86	0.85	0.88	0.87
								1.00	0.89	0.86	0.87	0.89	0.87
									1.00	0.83	0.81	0.76	0.77
										1.00	0.79	0.80	0.77
											1.00	0.88	0.86
												1.00	0.88
													1.00

mittleren Korrelationskoeffizienten größer als 0.8 ($r_{1186}^2 = 0.88$, $r_{1188}^2 = 0.81$, $r_{1189}^2 = 0.90$), die Signalintensitäten demnach gut reproduzierbar, wohingegen Signalintensitäten, die auf verschiedenen Mikroarraychargen gemessen wurden, eine schlechte Reproduzierbarkeit aufweisen ($r_{inter-charge}^2 = 0.48$). Mögliche Ursachen werden in Abschnitt 4.4 diskutiert.

Tabelle 4.10: Reproduzierbarkeit von Signalintensitätsmessungen von verschiedenen Mikroarraychargen. Ein humanes Kontrollserum wurde in jeweils drei Repetitionen auf Mikroarrays, die aus drei verschiedenen Produktionschargen (Chargennummern: 1186, 1188, 1189) stammen, inkubiert und die IgM-Signalintensitäten von verschiedenen Mikroarrays verglichen. Die Korrelationskoeffizienten, die aus Inkubationen derselben Mikroarraycharge resultieren, sind fett markiert.

Charge 1186			Charge 1188			Charge 1189		
1.00	0.92	0.82	0.40	0.38	0.48	0.73	0.68	0.70
	1.00	0.89	0.40	0.42	0.47	0.80	0.75	0.75
		1.00	0.37	0.39	0.38	0.82	0.81	0.80
			1.00	0.81	0.79	0.31	0.17	0.25
				1.00	0.84	0.35	0.22	0.27
					1.00	0.34	0.20	0.29
						1.00	0.92	0.87
							1.00	0.92
								1.00

4.3 Messung von Polyreaktivität monoklonaler Antikörper mit Zufallspeptidbibliotheken auf Mikroarrays

Die Verwendung von Zufallspeptid-Mikroarrays als Hochdurchsatzverfahren ermöglicht die Untersuchung der Antikörperbindung an eine Vielzahl von potentiellen Antigenen und stellt daher eine äußerst vielversprechende Methode zur Untersuchung von Antikörper-Polyreaktivität dar.

Zur Messung der Antikörper-Polyreaktivität mit Peptid-Mikroarrays wurden zehn monoklonale Antikörper von H. Wardemann (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) zur Verfügung gestellt (Tabelle 4.11). Die Antikörper stammen von einzelnen Gedächtnis-B-Zellen ab, die aus peripherem Blut von gesunden Spendern (VB, PN) gewonnen wurden. Die Antikörper wurden, wie beschrieben [150] exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber vier Antigenen (ssDNA, dsDNA, LPS, Insulin) getestet [149]. Ein Antikörper, der an alle vier Antigene gebunden hat, wurde als polyreaktiv (+) eingestuft. Konnte hingegen keine Bindung zu einem dieser Antigene festgestellt werden, wurde der Antikörper als nicht-reaktiv (–) klassifiziert [149]. Antikörper, die nur einige der untersuchten Antigene erkannten, wurden nicht verwendet. In der im Folgenden beschriebenen Untersuchung wird der Frage nachgegangen, ob Peptid-Mikroarrays eine geeignete Methode zur Messung von Antikörperpolyreaktivität darstellen und ob die von *Tiller et al.* erzielten Ergebnisse wiedergegeben werden können.

Dazu wurde die Reaktivität der zehn in Tabelle 4.11 gezeigten Antikörper gegenüber Zufallspeptiden gemessen (Signalintensitätshistogramme siehe Abb. 5, Anhang B).

Tabelle 4.11: Konzentration und Reaktivität der Antikörper aus IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen der gesunden Spender PN und VB. Die IgG Konzentration wurde von Cornelia Kreschel (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) durch ELISA bestimmt. * Die Reaktivität der Antikörper wurde von *Tiller et al.* [149] bestimmt (+ polyreaktiv, – nicht-reaktiv).

Antikörper	Konzentration [mg/ml]	Reaktivität*
PN16	0.15	+
PN89	0.12	+
PN138	0.09	-
PN115	0.24	-
VB1	0.33	+
VB4	0.15	+
VB142	0.23	+
VB161	0.38	-
VB176	0.30	-
VB18	1.00	-

Als Reaktivitätskontrollen wurden der stark polyreaktive Antikörper *ED38* [100, 159], der oligoreaktive Antikörper *eiJB40* [149] und der nicht-reaktive Antikörper *mGO53* [149] getestet. Die Inkubation der Antikörper erfolgte auf mit Peptidbibliothek P_{14+}^{300}

(Abschnitt 3.12) bedruckten Mikroarrays derselben Charge, am selben Tag. Die Peptid-Antikörper-Bindungen wurden mit einem fluorochrommarkierten anti-human-IgG Sekundärantikörper detektiert. Falschpositive Signale wurden, wie in Abschnitt 3.15.1 beschrieben eliminiert. Die Reaktivität der Antikörper wurde anhand der Bindungseigenschaften des jeweiligen Antikörpers gegenüber den nach Blankabzug verbliebenen 222 Peptiden analysiert. Wie in Abschnitt 4.1.5 gezeigt, kann die gemessene Signalintensität eines Antikörper-Peptid-Komplexes herangezogen werden, um einen Binder von einem Nichtbinder zu unterscheiden.

4.3.1 Antikörper-Polyreaktivität

Aus Abschnitt 4.1.4 wird deutlich, dass je höher die gemessene Signalintensität eines Antikörper-Peptid-Komplexes ist, desto höher ist die Affinität dieses Antikörpers zu diesem Peptid einzuschätzen. Daher wurde die mittlere Gesamtsignalintensität, die für alle Peptide auf dem Peptidarray gemessen wurde als Maß für die Reaktivität des Antikörpers herangezogen. In Abb. 4.18-A ist die mittlere Signalintensität der drei Antikörperreaktivitätskontrollen, sowie der zehn Testantikörper dargestellt.

Betrachtet man zunächst nur die Kontrollantikörper (*ED38*, *eiJB40* und *mGO53*), so gibt die gemessene Signalintensität sehr gut die erwartete Reaktivität der Antikörper wieder. Je höher die Signalintensität, desto polyreaktiver der Antikörper.

Jedoch werden die Ergebnisse von *Tiller et al.* nicht sehr gut reproduziert (Abb. 4.18). Keiner der getesteten Antikörper zeigt eine ähnlich hohe Signalintensität wie der polyreaktive Kontrollantikörper. Jedoch zeigen auch die als nicht-reaktiv eingestuften Antikörper immer eine höhere Signalintensität als der nicht-reaktive Kontrollantikörper.

Außerdem wurde ein weiteres Kriterium zur Einschätzung von Antikörperpolyreaktivität, nämlich die Bandbreite der Peptiderkennung, untersucht. Dafür wurden die Peptide als *Binder* oder *Nichtbinder* klassifiziert und der Anteil der gebundenen Peptide auf dem Peptidarray bestimmt.

Wie in Abschnitt 4.1.5 gezeigt wurde, eignet sich der von der Mikroarray-Analysesoftware Genespotter (MicroDiscovery GmbH) bereitgestellte p-Wert, um eine Reaktivitätsgrenze festzulegen, die *Binder* und *Nichtbinder* unterscheidet. Alle Peptide, die einen p-Wert kleiner als 0.05 aufwiesen, wurden als *Binder* und alle Übrigen als *Nichtbinder* definiert. Der Anteil der gebundenen Peptide misst die Reaktivität eines Antikörpers. In Abb. 4.18-B ist der prozentuale Anteil der Peptide, die nach dem p-Wert Kriterium als gebunden definiert wurden, für alle Antikörper dargestellt. Die Reaktivität der Reaktivitätskontrollantikörper wird sehr gut abgebildet. Je höher die erwartete Polyreaktivität, desto mehr Peptide wurden erkannt. Jedoch konnten die zehn getesteten Antikörper nicht den von *Tiller et al.* bestimmten Reaktivitätsklassen zugeordnet werden. Alle untersuchten Antikörper überstiegen die Reaktivität des nicht-reaktiven Kontrollantikörpers bei weitem.

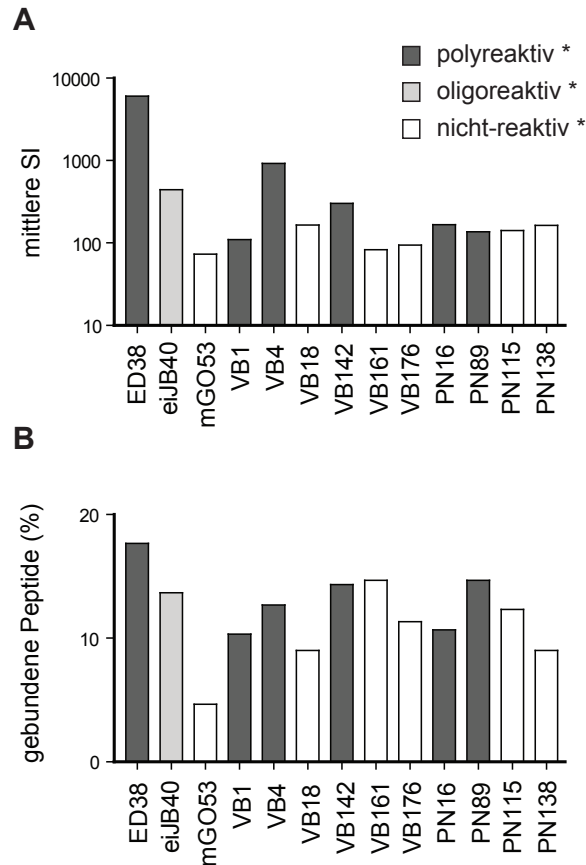


Abbildung 4.18: Messung der Polyreaktivität monoklonaler Antikörper. Zehn humane monoklonale Antikörper aus IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen der gesunden Spender PN und VB, sowie drei Antikörperreaktivitätskontrollen *ED38* (polyreaktiv), *eiJB40* (oligoreaktiv) und *mGO53* (nicht-reaktiv) wurden auf Peptid-Mikroarrays inkubiert und die IgG-Bindungssignale detektiert. * Die Reaktivität der Antikörper wurde von *Tiller et al.* [149] bestimmt. **A:** Polyreaktivität monoklonaler Antikörper gemessen an der mittleren Signalintensität über den gesamten Mikroarray. **B:** Polyreaktivität monoklonaler Antikörper gemessen am Anteil der gebundenen Peptide auf dem Mikroarray. Als gebunden wird ein Peptid definiert, das einen p-Wert kleiner als 0.05 aufweist.

4.3.2 Polyreaktivität von monoklonalen Antikörpern und Antikörpermischungen in Serum

Eine Immunantwort gegen ein Antigen bringt eine Vielzahl von Antikörpern hervor, die gegen die verschiedenen Epitope des Antigens gerichtet sind. Eine solche polyklonale Immunantwort zielt auf eine möglichst große Bandbreite der Erkennung des Antigens ab. Man würde demnach für Antikörpermischungen, wie sie z.B. in Seren vorkommen, eine stärkere Polyreaktivität erwarten, als für einen monoklonalen Antikörper (mAk).

Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Reaktivität eines humanen monoklonalen Antikörpers PN46_{rev} (PN46, auf die Keimbahnsequenz revertiert) gegenüber einer Zufalls-peptidbibliothek untersucht und mit der Reaktivität einer Serumprobe verglichen. Die zur rekombinanten Herstellung des monoklonalen Antikörpers benötigte Plasmid-DNA wurde von H. Wardemann (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) zur Verfügung gestellt und daraus der Antikörper, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben, exprimiert (experimentelle Daten siehe Tabelle 1, Anhang A). Ob der monoklonale Antikörper in seiner funktionellen Struktur vorliegt, wurde durch SDS-PAGE überprüft (Abb. 1, Anhang A). Die Reaktivität dieses Antikörpers wurde von *Tiller et al.* als nicht-polyreaktiv bestimmt [149].

Die ideale mAk-Konzentration für die Inkubation von Peptid-Mikroarrays (0.1 mg/ml) wurde durch eine Konzentrationsreihe, die einen Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 1 mg/ml umfasste, bestimmt. Des Weiteren wurde die Reproduzierbarkeit der Signalintensitätsmessung für die Antikörper-Peptid-Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern untersucht. Dazu wurden vier identische Inkubationen mit dem monoklonalen Antikörper (PN46_{rev}) durchgeführt und die Korrelation der Signalintensitäten aus diesen vier Messungen bestimmt. Ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0.91$ (0.89 – 0.93) legt die sehr gute Reproduzierbarkeit von Signalintensitätsmessungen mit Zufallspeptid-Mikroarrays dar.

Als Vergleichsprobe einer Antikörpermischung diente ein Serumgemisch aus 22 humanen Seren. Der monoklonale Antikörper, die Serumprobe, sowie ein Gemisch aus mAk und Serumprobe wurden auf Mikroarrays, die mit Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ (Abschnitt 3.12) bedruckt sind, unter identischen experimentellen Bedingungen inkubiert (Signalintensitätshistogramme siehe Abb. 6, Anhang B). Dabei wurde für alle Proben eine IgG-Konzentration von 0.1 mg/ml eingestellt. Die Bindungsdetektion der IgG-Antikörper erfolgte mit einem fluorochrommarkierten Sekundärantikörper. Falschpositive Signale, die von der Bindung des Sekundärantikörpers an die immobilisierten Peptide resultieren, wurden, wie in Abschnitt 3.15.1 beschrieben, aus allen Datensätzen eliminiert.

Als Maß für die Polyreaktivität der drei Proben (mAk, Serum, Serum + mAk) wurde der Anteil der auf dem Mikroarray gebundenen Peptide bestimmt (Abschnitt 4.3.1). Da die Mikroarrays mit einer anderen Analysesoftware ausgewertet wurden, stand der p-Wert nicht zur Verfügung, um ein Peptid als erkannt zu definieren. Stattdessen wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) als Kriterium herangezogen, das, wie in Abschnitt 4.1.5 dargelegt wurde, ebenfalls ein geeignetes Kriterium darstellt, um Peptide in Affinitätsklassen zu unterteilen. Dabei wird bei einem $SNR > 3$ ein Peptid als vom Antikörper gebunden

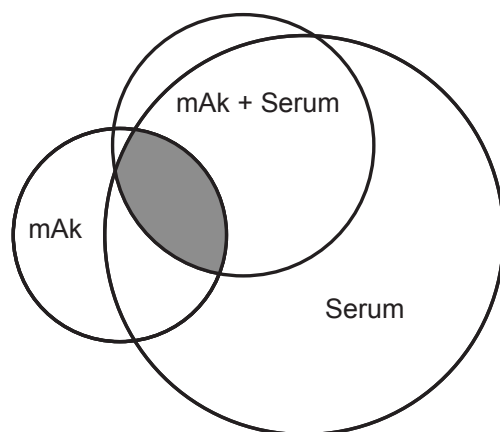


Abbildung 4.19: Venn-Diagramm zur Darstellung der Polyreaktivität eines monoklonalen Antikörpers im Vergleich zu einer Antikörpermischung. Der monoklonale Antikörper (mAk) PN46 revertiert, eine Serumprobe und ein Gemisch aus Serum und mAk wurden auf Peptid-Mikroarrays inkubiert und die IgG-Bindungssignale bestimmt. Der Anteil der gebundenen Peptide wurde bestimmt. Peptide, die eine $SNR > 3$ aufwiesen, wurden als gebunden definiert. Die Fläche der Kreise stellt die Anzahl der gebundenen Peptide dar. Überlappende Bereiche bestimmen die Anzahl der Peptide, die von zwei bzw. allen drei Proben (grauer Fläche) gleichermaßen gebunden wurden.

definiert [147, 163]. Der Anteil der gebundenen Peptide ist für die drei Proben in einem Venn-Diagramm (Abb. 4.19) graphisch dargestellt. Die Fläche der Kreise definiert die Anzahl der gebundenen Peptide, wobei überlappende Bereiche die Anzahl der Peptide bestimmt, die von zwei bzw. allen drei Proben gleichermaßen gebunden wurden.

Wie erwartet, ist die Reaktivität der Serumprobe am größten. Von insgesamt 8707 Peptiden auf den Peptid-Mikroarrays wurden 11% gebunden. Hingegen erkennt der monoklonale Antikörper nur 3.1% der Peptide (Sequenzen siehe Tabelle 6, Anhang B) auf dem Mikroarray. Die Reaktivität der Mischung aus Serum und mAk ist mit 4.7% erkannter Peptide (Sequenzen siehe Tabelle 7, Anhang B) sehr viel geringer als die der Serumprobe. Allerdings werden von diesen 4.7% etwa 86% der Peptide auch von den Serum-IgG-Antikörpern erkannt, d.h. lediglich die Bandbreite der Erkennung wird geringer, jedoch ändert sich das Bindungsmuster nur gering.

Diese Beobachtung wird auch bestätigt, wenn man die Peptide, die gebunden wurden, genauer betrachtet. Eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung der von den drei IgG-Proben gebundenen Peptide ergab, dass die Serumprobe und das Gemisch aus Serum und monoklonalem Antikörper in ihrer Aminosäurezusammensetzung ähnliche Peptide binden (Abb. 4.20). 53% der vom monoklonalen Antikörper gebundenen Peptide werden gleichermaßen von den Serumantikörpern erkannt. Jedoch unterscheidet sich die Aminosäurezusammensetzung der übrigen gebundenen Peptide. Der Anteil der aromatischen Aminosäuren (F, W, Y) ist bei den vom mAk gebundenen Peptiden deutlich erhöht. Dagegen wurden Peptide mit aziden Aminosäuren (D, E, N, Q) seltener gebunden (Abb. 4.20).

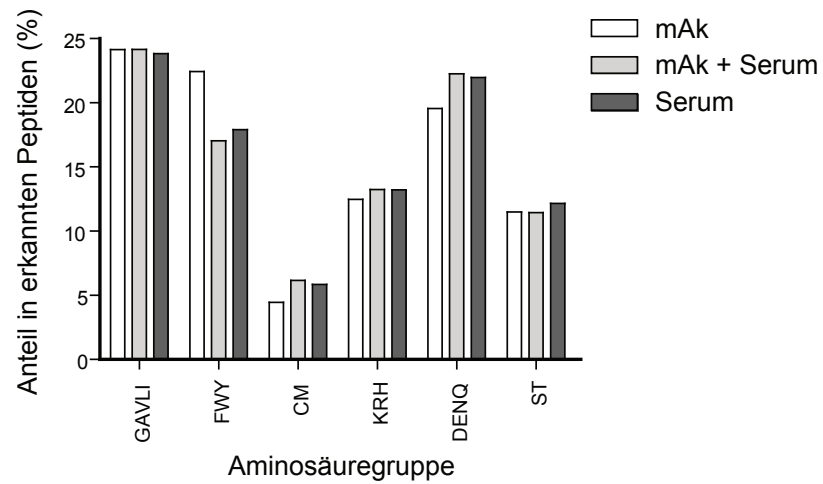


Abbildung 4.20: Aminosäurezusammensetzung gebundener Peptide. Der monoklonale Antikörper (mAk) PN46_{rev}, eine Serumprobe und ein Gemisch aus Serum und mAk wurden auf Peptid-Mikroarrays inkubiert und die IgG-Bindungssignale bestimmt. Peptide, die eine $SNR > 3$ aufwiesen, wurden als gebunden definiert. Die Aminosäurezusammensetzung der von den Antikörperproben gebundenen Peptide wurde bestimmt. Die Aminosäuren wurden in Gruppen gemäß ihrer physikochemischen Eigenschaften unterteilt (aliphatisch: GAVLI, aromatisch: FWY, schwefelhaltig: CM, basisch: KRH, azid: DENQ, hydroxy: ST). Der prozentuale Anteil der Aminosäuregruppen in den gebundenen Peptiden ist für die drei Antikörperproben dargestellt.

4.4 Diskussion

Eine zuverlässige Messmethode ist die Basis für die systematische Untersuchung von Antikörper-Peptid-Wechselwirkungen, um verlässliche Aussagen über die Spezifität, Reaktivität und Affinität eines Antikörpers treffen zu können. Peptid-Mikroarrays als Methode für Antikörper-Peptid-Bindungsstudien müssen sich demnach durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Signalintensitäten auszeichnen und die Bindungsstärke der untersuchten Antikörper-Peptid-Komplexe genau wiedergeben. Dabei gibt es große Unterschiede zwischen Bindungsmessungen mit monoklonalen Antikörpern, mit Antikörpermischungen und mit Antikörpern in Serum, die es einzeln zu betrachten gilt.

Technologische und experimentelle Einflussfaktoren auf die Verlässlichkeit von Antigen-Antikörper-Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays

Der erste Teil dieses Kapitels (Abschnitt 4.1) befasst sich mit der Validierung von Mikroarray-Bindungsmessungen monoklonaler Antikörper gegenüber Epitop-homologen und -nichthomologen Peptiden, welche in dieser Form erstmals durchgeführt wurde. Dabei wurde für vier verschiedene Glasträgertypen (*Crn*, *Eri*, *Gnx*, *Grn*) die Variabilität der gemessenen Signalintensitäten bestimmt (Abschnitt 4.1.1). Der mittlere relative Fehler der Messung liegt bei $CV = 0.28$, was eine charakteristische Größenordnung für Bindungsstudien dieser Art darstellt [36, 109]. Im Mikroarray Datensatz *Eri* wurde für hohe Signalintensitäten ein sehr kleiner relativer Fehler (weniger als 10%) ermittelt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Signalsättigung handeln könnte. Jedoch wurde weder von der Mikroarrays-Scanner-assoziierten Software noch von der Bildauswertungssoftware ein solcher Effekt dokumentiert. Demzufolge verfügen die *Eri* Glasträger über optimale Oberflächeneigenschaften, um starke Antikörper-Peptid-Interaktionen zu messen. Da der relative Messfehler für schwache Antikörper-Peptid-Interaktionen allerdings im Vergleich zu den anderen Glasträgertypen sehr hoch ist, wurde von einer Verwendung der *Eri* Glasträger Abstand genommen. Stattdessen wurde für alle folgenden Untersuchungen, die in Abschnitt 4.1 durchgeführt wurden, *Gnx* Glasträger derselben Produktionscharge verwendet, da sie den qualitativen Ansprüchen von allen untersuchten Mikroarraytypen am Besten genügen.

Im Abschnitt 4.1.1 wurde außerdem der Frage nachgegangen, ob gemessene Signalintensitäten reproduzierbar sind. Im Datensatz *Crn* werden die absoluten Signalintensitäten weniger gut reproduziert als in den anderen Datensätzen. Diese Diskrepanz könnte auf den Immobilisierungsprozess zurückzuführen sein. Die Epoxy-funktionalisierten *Crn* Glasträger wurden, laut Hersteller, ebenfalls unter den experimentellen Bedingungen gedruckt, die für Aldehyd-funktionalisierte Glasträger (*Gnx*, *Eri* und *Grn*) optimiert wurden. Unter diesen Bedingungen verläuft der Immobilisierungsprozess auf *Crn* Glasträgern weniger chemoselektiv [89, 153] und führt folglich zu einer geringeren Reinheit oder unregelmäßigen Dichte der bedruckten Peptide, was eine höhere Variabilität der Signalintensität zur Folge hat.

Affinitätsmessung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit Peptid-Mikroarrays

Inwieweit Peptid-Mikroarrays für quantitative Bindungsstudien geeignet sind, wurde in den Abschnitten 4.1.2 - 4.1.4 untersucht. Dabei wurde ermittelt, wie genau die Bindungsstärke eines Antikörper-Peptid-Komplexes durch die gemessene Signalintensität wiedergegeben werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die gemessene Signalintensität in bestimmten Konzentrationsbereichen sehr gut mit der Bindungsstärke korreliert. Je kleiner die eingesetzte Antikörperkonzentration ist, desto größer ist der Korrelationskoeffizient. Abweichungen entstehen bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen. Dort sind die Hintergrundsignale im Vergleich zu den Messungen bei niedrigeren Antikörperkonzentrationen erhöht, was auf unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen ist. Außerdem wird bei hohen Antikörperkonzentrationen eine Verkleinerung der Signalintensitäten für starke Binder ($pK_D = 7.5 - 9$) beobachtet, was durch konkurrierende Bindungen der Antikörper an mehrere Peptide hervorgerufen werden kann.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob Peptid-Mikroarrays ein geeignetes Werkzeug zur Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstante K_D darstellen (Abschnitt 4.1.3). Aus den durchgeführten Analysen folgt, dass bei Mikroarraybindungsstudien der Einsatz sehr kleiner Antikörperkonzentrationen zu einer Überschätzung von K_D und der Einsatz sehr großer Antikörperkonzentrationen zu einer Unterschätzung von K_D führt. Diese Diskrepanz könnte von verschiedenen Faktoren herrühren, die nicht im Massenwirkungsgesetz berücksichtigt werden. So kann eine hohe Oberflächendichte der auf den Glasträgern immobilisierten Peptide dazu führen, dass sterische Hinderung zwischen gebundenen Antikörpermolekülen auftritt [143]. Dies führt zu einer schnellen Sättigung der Bindungsstellen. Des Weiteren bewirken zu hohe Antikörperkonzentrationen unspezifische Bindung auf der Mikroarrayoberfläche. Außerdem sind Reaktionen an Oberflächen durch eine andere Kinetik charakterisiert als Reaktionen in Lösung, denn die freie Diffusion des einen Bindungspartners an die feste Oberfläche wird behindert [1]. Als Folge können die Daten von niedrig-affinen Peptiden nicht akkurat an das Modell angepasst werden, es sei denn der Antikörper wird in sehr hohen Konzentrationen inkubiert. Jedoch wurde gezeigt, dass Messungen mit Antikörperkonzentrationen über $3 \mu\text{M}$ bereits anfällig für unspezifische Bindung sind. Dennoch konnten, wie in Abschnitt 4.1.4 gezeigt, die K_D -Werte von CB4-1-Peptid-Komplexen durch SI-Messungen adäquat wiedergegeben werden. Eine Verbesserung der Bindungseffektivität könnte durch eine stärkere Durchmischung der Probenlösung auf dem Mikroarray und durch eine höhere Temperatur während der Inkubation erreicht werden. Aber auch die Genauigkeit von SPR-Messungen muss an dieser Stelle diskutiert werden, um mögliche Gründe für die Abweichungen zu erklären. Die SPR-Messungen wurden so durchgeführt, dass der Antikörper immobilisiert und die Peptidproben in Lösung auf den Goldchip gegeben wurde. Zum einen würde man eine höhere Sensitivität der Messung durch einen umgekehrten Aufbau erreichen [37]. Zum anderen sollten aus Gründen der Vergleichbarkeit von SPR und Mikroarray-Messungen die Rollen von Probe und Analyt gleich sein. Außerdem unterliegt die SPR-Messung selbst einer gewissen Schwankung, die sich um die Größenordnung von etwa einer Magnitude bewegt.

Dass Mikroarrays für qualitative Bindungsstudien ein sehr gutes Werkzeug darstellen, wurde in Abschnitt 4.1.5 dargelegt. Mit einer Vorhersagegenauigkeit von bis zu 94% kann ein *Binder* von einem *Nichtbinder* unterschieden werden. Die Klassifizierung der untersuchten Peptide in *Binder* und *Nichtbinder*, die bereits für Antikörper-Peptid-Bindungsstudien auf Cellulosemembranen gezeigt wurde [163], basiert auf dem Vergleich der Signalintensität mit dem gemessenen lokalen Hintergrundsignal. Ein gebundenes Peptid bringt eine erheblich höhere Signalintensität hervor als dessen lokaler Hintergrund. Zwar kann durch experimentelle Schwankungen der Hintergrund auf einem Mikroarray sehr unregelmäßig, z.B. durch Verunreinigungen heller sein, jedoch würden sich solche Effekte auch auf die Signalintensität des Peptidspots auswirken. Eine Klassifizierungsmethode, die ausschließlich auf der Signalintensität basiert, könnte solche experimentellen Schwankungen nicht ausgleichen.

Die Kriterien zur Unterteilung in Affinitätsklassen (p-Wert, SNR) haben sich als vergleichbar gut erwiesen. Zwar lieferte die Klassifizierung mit dem p-Wert-Kriterium etwas bessere Ergebnisse, jedoch ist der p-Wert ein von der Analysesoftware Genespotter bereitgestellter Wert, der bei Verwendung einer anderen Software nicht zur Verfügung steht. Das Signal-Rausch-Verhältnis stellt demnach als universell verfügbarer Wert das geeignetere Kriterium dar.

Technologische und experimentelle Einflussfaktoren auf die Verlässlichkeit von Antikörper-Zufallspeptid-Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays

Im zweiten Teil dieses Kapitels (Abschnitt 4.2) wird die Verlässlichkeit von Serumantikörper-Bindungsstudien gegenüber Zufallspeptidbibliotheken untersucht.

Die Vorteile der Verwendung von zufällig generierten Sequenzen gegenüber einer Antigenbibliothek liegen zum einen in der Unvoreingenommenheit der Bindungsmessung und zum anderen in ihrer universellen Eignung für jegliche Bindungsstudien, auch für solche, bei denen kein spezifisches Antigen bekannt ist. In anderen Arbeiten konnten Zufallspeptide bereits erfolgreich zur Identifizierung von Antikörperepitopen [129] und Bindungsmotiven von Proteinen [38] verwendet werden. Außerdem stellt auch die Verwendung von Antigenbibliotheken nicht die spezifische Erkennung durch die zugehörigen Antikörper sicher, sondern ist stark abhängig von der verwendeten Messmethode [31]. Dennoch stellt sich die Frage nach der Spezifität von Bindungsmessungen mit Zufallspeptiden. Dass dies überhaupt möglich ist, ist auf eine zentrale Eigenschaft von Antikörpern, der Polyspezifität [53, 54] zurückzuführen. Antikörper erkennen und binden weitaus mehr als ihr Antigen, so auch Peptide, deren Sequenzen zufällig generiert sind und mit großer Wahrscheinlichkeit nicht direkt auf ein Antigen zurückzuführen sind, was auch in Kapitel 4.3 gezeigt wurde. Die Bindungsstärke von Antikörpern an zufällige Peptide ist, wie erwartet, deutlich schwächer, als die an Epitop-homologe Peptide und der Anteil unspezifischer Bindung ist viel größer. Dennoch können aufgrund der geringen Variabilität und hohen Reproduzierbarkeit der Signalintensitätsmessungen die wenigen gemessenen Antikörper-Peptid-Interaktionen als spezifisch angesehen werden.

Die Reproduzierbarkeit von Serumantikörper-Bindungsstudien gegenüber Zufallspeptidbibliotheken wurde ebenfalls untersucht (Abschnitt 4.2.3). Innerhalb von Mikroarraychar-

gen sind die gemessenen Signalintensitäten sehr gut reproduzierbar ($r^2 = 0.88$). Zwar erreichen die Bindungsmessungen von Serumantikörpern gegenüber Zufallspeptiden nicht die hohen Korrelationskoeffizienten, wie sie für die Bindungsmessungen monoklonaler Antikörper gegenüber Epitop-homologen Peptiden ($r^2 = 0.94$) (Abschnitt 4.1.1) erzielt wurden, jedoch sind diese Werte aufgrund der hohen Varianz der Messung als sehr gut einzuschätzen.

Ein großes Problem, das bisher nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte, stellt die fehlende Vergleichbarkeit von Messergebnissen dar, die von verschiedenen Mikroarraychargen stammen. Mikroarrays verschiedener Produktionschargen, d.h. Mikroarrays, die an verschiedenen Tagen bedruckt wurden, liefern nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse. Dies wurde für verschiedene Beispiele gezeigt (Abschnitt 4.1.1 und 4.2.3). Der Druckprozess, bei dem die Peptide auf der Glasträgeroberfläche immobilisiert werden, ist enormen Schwankungen ausgesetzt [135, 136], sei es durch die Beschaffenheit der zu druckenden Peptidlösungen, durch den Zustand der Glasträger, deren Haltbarkeit im unbedruckten Zustand nur sehr begrenzt ist oder auch durch Schwankungen der äußeren experimentellen Bedingungen. Ein Tropfen Peptidlösung, der während des Druckens auf den Glasträger aufgebracht wird, kann beispielsweise, je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit, unterschiedlich schnell verdunsten. Dies beeinflusst die Peptidkonzentration in der Drucklösung und somit die Peptiddichte auf dem Mikroarray.

Außerdem kann die Verwendung verschiedener Glasträgerchargen, also Glasträger, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert wurden, zu unterschiedlichen Signalintensitäten führen. Die Glasträgeroberfläche kann chargenabhängig unterschiedliche Eigenschaften, z.B. Kontaktwinkel aufweisen. Der Kontaktwinkel bestimmt die Hydrophobizität einer Glasoberfläche [55, 154]. Ein abgesetzter Peptidtropfen auf einer hydrophoben Oberfläche, berührt diese mit der kleinstmöglichen Fläche, während der Tropfen auf einer hydrophilen Oberfläche breit zerläuft. Unterschiedliche Kontaktwinkel wirken sich demnach ebenfalls auf die Spotgröße und die Peptiddichte auf dem Mikroarray aus.

Diese technologischen Gegebenheiten lassen sich schwer kontrollieren. Für DNA-Mikroarrays können diese Schwankungen durch Normierung der Signalintensitäten ausgeglichen werden [94], was für Protein- oder Peptid-Mikroarrays bisher nicht gelang. Ein vielversprechender Ansatz stellt die Entwicklung einer internen Kontrolle auf jedem verwendeten Mikroarray dar [109]. Anhand des Signals dieser Kontrolle können alle technologischen und experimentellen Schwankungen herausgerechnet und somit die Daten normiert werden. Die Antikörperkontrollen, die sich auf den hier verwendeten Mikroarrays befinden, sind dafür allerdings nicht geeignet, da Proteine leicht denaturieren und somit die Signale der Antikörperkontrollen älterer und neuerer Mikroarrays nicht vergleichbar wären. Stattdessen könnte ein stabiles Peptid oder ein anderes stabiles chemisches Molekül zweckdienlich sein. Eine optimale Methode zur Normierung von Peptid-Mikroarraydaten zu finden ist ein wichtiges Ziel weiterer Arbeiten. Da in dieser Arbeit keine Untersuchungen hinsichtlich einer geeigneten Normierungsmethode durchgeführt wurden, dürfen folglich bei der Messung von Antikörper-Peptid-Interaktionen nur Mikroarrays derselben Charge verwendet werden, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Eine weitere Quelle technologischer Varianz resultiert abermals aus dem Druckprozess. Im Abschnitt 4.2.1 wurde eine Signalabnahme innerhalb von Mikroarrays des Typs $P_{13,15}^{9182}$

festgestellt. Auf diesen Mikroarrays sind über 9000 Peptide immobilisiert. Demnach nimmt der Druckprozess, der beginnend bei der obersten Reihe schrittweise bis zur letzten Reihe erfolgt, einige Stunden in Anspruch. Dies führt dazu, dass die Reaktivität der Linkergruppe, die das Peptid mit der Glasträgeroberfläche verknüpft, abnimmt und somit die Immobilisierung der Peptide reihenweise ineffektiver wird. Somit wirkt sich die Druckreihenfolge direkt auf das gemessene Signal aus, ein Phänomen, das schon beobachtet wurde [36].

Zusätzlich dazu korreliert auf den hier untersuchten Mikroarrays die Signalabnahme mit der Anordnung der verschiedenen Sub-Bibliotheken. Beginnt eine neue Sub-Bibliothek, nimmt die Signalintensität in diesem Unterblock sprunghaft ab. Diese Schwankungen können dadurch hervorgerufen werden, dass die einzelnen Sub-Bibliotheken aus unterschiedlichen Syntheserchargen stammen und daher unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen, was sich auf die Immobilisierungseffizienz auswirkt. Da auf die Zusammensetzung der hier verwendeten Zufallspeptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ keinen Einfluss genommen werden konnte, wurden einzelne Sub-Bibliotheken (13mer Zufallspeptide und 15mer Peptide mit S, T oder Y in Position acht der Peptidsequenz) von der Datenanalyse ausgeschlossen.

Dass es für Peptid-Mikroarrays kein einheitliches Herstellungs-, Hybridisierungs- und Detektionsverfahren gibt [34, 107, 123, 124, 133], verdeutlicht, wie vielfältig die Technologie ist und welcher außerordentlich großen Variabilität sie unterliegt. So mussten allein in dieser Arbeit die experimentellen Bedingungen, wie z.B. Analytkonzentration und Sekundärantikörperkonzentration für jedes untersuchte System neu bestimmt werden.

Die optimale Serumverdünnung wurde für Serumantikörperbindungsstudien abhängig vom betrachteten Antikörperisotyp bestimmt (Abschnitt 4.2.1). Die getrennte Analyse einzelner Antikörperisotypen im humanen System ist notwendig, da IgG in der Regel in, verglichen mit IgM, zehnfach erhöhter Konzentration in humanem Blut vorhanden ist [77]. Die Ergebnisse zeigen, dass eine gleichzeitige Detektion von IgG und IgM zu Signalverlust führt, sei es durch ein vermindertes Signal-Rausch-Verhältnis bei zu hoher IgG-Konzentration oder ein zu schwaches Signal für IgM durch zu starke Verdünnung der Probe.

Ein weiteres Argument für die getrennte Betrachtung von Antikörperisotypen ist, dass die hier verwendeten Sekundärantikörper in Mischung Kreuzreaktivität aufweisen. In Abschnitt 4.2.1 wurde gezeigt, dass anti-Human-IgG merklich kreuzreaktiv gegen IgM-Antikörper ist. Dies hängt damit zusammen, dass der verwendete anti-Human-IgG-A546 Antikörper sowohl die schwere als auch die leichte Kette von IgG bindet [44]. Da IgG- und IgM-Antikörper ähnliche leichte Ketten aufweisen, kann anti-IgG also auch an IgM-Antikörper binden. Folglich muss für Mischdetektionen von IgG und IgM ein anti-IgG Sekundärantikörper verwendet werden, der spezifisch die γ -Kette von IgG-Antikörpern erkennt. Einige Untersuchungen diesbezüglich wurden bereits durchgeführt (Christin Schläwicke, ehem. AG Systemimmunologie, HU Berlin).

Eine große Fehlerquelle stellt die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper an die Peptide der Probenbibliothek dar. Diese falschpositiv gebundenen Peptide müssen von denen, die tatsächlich von der Antikörperprobe gebundenen wurden unterschieden werden. Zur Ermittlung der falschpositiven Signale wurden Blank-Inkubationen, d.h. die Inkubation von ausschließlich Sekundärantikörper, durchgeführt und ein neues Verfahren

etabliert, um falschpositive Signale zu identifizieren und zu eliminieren (Abschnitt 4.2.2).

Als falschpositive Signale wurden in Vorarbeiten [22] solche definiert, die bei der Blank-Kontrolle eine hohe Signalintensität aufwiesen und die höchsten 10% wurden aus allen Datensätzen entfernt. Diese Methode stellte sich jedoch als zu ungenau und unspezifisch heraus, da so zum einen nicht alle falschpositiv erkannten Peptide identifiziert wurden. Zum anderen können hohe Signalintensitäten auch von experimentellen Artefakten herühren. Beispielsweise kann die Verteilung der Signalintensität auf einem Mikroarray sehr unregelmäßig sein. Regionen, in denen z.B. wegen einer Flecks höhere Signalintensitäten gemessen werden, würden als falschpositive Signale missinterpretiert. Ein solches Artefakt würde auch eine Erhöhung der lokalen Hintergrundsignalintensität hervorrufen und wäre demnach nicht peptidspezifisch. Daher sollte auch immer der lokale Hintergrund eines Signals berücksichtigt werden.

Demnach wurde das Signal-Rausch-Verhältnis, also das Signal relativ zum lokalen Hintergrundsignal verwendet, um ein gebundenes Peptid von einem nicht gebundenen Peptid zu unterscheiden. Die Grenze wurde als $\text{SNR} > 3$ definiert, da in Abschnitt 4.1.5 bereits dargelegt wurde, dass $\text{SNR} > 3$ ein geeignetes Kriterium darstellt, um Binder und Nichtbinder zu unterscheiden.

Ein ähnliches Verfahren wird von *Maeurer et al.* [56] durchgeführt. Auch hier dient eine Inkubation mit ausschließlich Sekundäntikörper als Grundlage, um falschpositive Signale zu identifizieren. Als gebunden wird ein Peptid definiert, dessen Signalintensität größer als die Hintergrundsignalintensität ist. Der Grenzwert für die Hintergrundsignalintensität wird wiederum aus dem Signal von leeren Spots, also Spots bei denen kein Peptid, sondern ausschließlich Puffer auf den Mikroarray gedruckt wurde, bestimmt. Diese leeren Spots sind allerdings auch den oben beschriebenen experimentellen Schwankungen ausgesetzt und somit ist fraglich, ob die Bestimmung des Hintergrundgrenzwertes präzise ist.

Messung von Polyreaktivität mit Zufallspeptid-Mikroarrays

Neben Spezifität ist auch Polyreaktivität eine häufig beobachtete Eigenschaft von Antikörpern, deren Ausmaß experimentell schwer zu bestimmen ist. Zur Messung von Antikörper-Polyreaktivität werden verschiedene Methoden, wie Western Blot, Immunhistologie oder ELISA verwendet [6, 26, 97] und es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse solcher Untersuchungen von der Messmethode abhängig sein können [31]. Dies verdeutlicht, dass die Entwicklung einer universell verwendbaren Messmethode unerlässlich ist. Im dritten Teil dieses Kapitels (Abschnitt 4.3) wird der Frage nachgegangen, ob Zufallspeptid-Mikroarrays zur Untersuchung von Antikörper-Polyreaktivität verwendet werden können.

Um Polyreaktivität von Antikörpern einzuschätzen (Abschnitt 4.3.1), wurde zum einen die Gesamtsignalintensität des Mikroarrays und zum anderen die Bandbreite der erkannten Peptide als Kriterien verwendet. Zwar konnten die von *Tiller et al.* [149] ermittelten Reaktivitäten der zehn Testantikörper mit beiden Methoden nicht reproduziert werden, aber die Reaktivität der Kontrollantikörper wird korrekt wiedergegeben. Bei der Verwendung der Gesamtsignalintensität kann eine hohe Signalintensität auch daraus resultieren, dass ein Antikörper sehr spezifisch an ein einzelnes Peptid, dieses jedoch mit

hoher Affinität, bindet. Polyreaktivität wird jedoch als die Reaktivität gegenüber einer Vielzahl von Bindungspartnern definiert [159], unabhängig davon wie groß die jeweilige Bindungsstärke ist. Daher wird die Bandbreite der Peptiderkennung als das geeignetere Maß für Antikörper-Polyreaktivität erachtet.

Ein Vergleich mit den von *Tiller et al.* bestimmten Reaktivitäten zeigt, dass die Reaktivität mit der hier verwendeten Methode generell als größer eingeschätzt wird. Dies könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Messmethoden zurückzuführen sein. *Tiller et al.* bestimmen die Reaktivität der Antikörper durch ELISA. Die Sensitivität der Mikroarray-Technologie ist jedoch um ein Vielfaches größer als die des Standard-ELISA [133]. Mit Peptid-Mikroarrays kann die Reaktivität der Antikörper also viel genauer bestimmt werden und liefert daher größere Reaktivitäten. Des Weiteren wird Polyreaktivität nach *Wardemann et al.* durch die Erkennung von nur einigen immunsystemspezifischen Antigenen bestimmt [159]. Die Peptidbibliothek auf dem Mikroarray wurde so gewählt, dass diese maximal divers ist. Folglich ist das Spektrum der möglichen Bindungspartner deutlich größer und somit auch die Wahrscheinlichkeit, dass der Antikörper etwas erkennt.

Trotzdem die Reaktivitätsmessungen, die hier vorgenommen wurden und die von *Tiller et al.* durchgeführten, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wurde gezeigt, dass Mikroarrays mit Zufallspeptidbibliotheken die Möglichkeit bieten, Antikörperpolyreaktivität zu messen, da die Reaktivität der Kontrollantikörper sehr gut wiedergegeben werden konnte. Welche der beiden Meßmethoden letztlich die geeignetere ist, bleibt offen, jedoch scheinen Mikroarrays durch die höhere Sensitivität der Bindungsstärkemessung mehr Potential zu besitzen.

In Abschnitt 4.3.2 wurden vergleichenden Reaktivitätsmessungen dreier Antikörperproben (mAk, Serum, Serum + mAk) durchgeführt. Wie zu erwarten war, binden Antikörpermischungen eine größere Bandbreite potentieller Antigene als ein einzelner monoklonaler Antikörper. Die Mischung aus Serum und monoklonalem Antikörper ist weniger reaktiv als die Serumprobe allein. Dies könnte durch eine höhere partielle Antikörperkonzentration hervorgerufen werden. Zwar wurden die Proben alle mit derselben Gesamt-IgG-Konzentration inkubiert, jedoch liegt in der Serum-mAk-Mischung der monoklonale Antikörper im Überschuss vor. Demzufolge verschiebt sich das Gleichgewicht der Antikörperadsorption hin zu dem Reaktionspartner mit der höchsten Konzentration. Andere Antikörper-Peptid-Wechselwirkungen werden dadurch verdrängt und die Polyreaktivität wird demnach geringer.

Außerdem wurden die von drei IgG-Proben (mAk, Serum, Serum + mAk) gebundenen Peptide auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin analysiert. Die bevorzugte Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen wird mit hoher struktureller Flexibilität und Kreuzreaktivität eines Antikörpers assoziiert, wohingegen die Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen auf eine hohe Spezifität des Antikörpers hinweist [145]. Die bevorzugte Bindung des untersuchten monoklonalen Antikörpers (PN46_{rev}) an Peptide mit einem erhöhten Anteil aromatischer und einem geringeren Anteil geladener Aminosäuren deutet demnach auf Polyreaktivität hin.

5 Ergebnisse und Diskussion II: Anwendung zur serologischen Diagnose

Nicole Bruni erarbeitete in ihrer Dissertation einen statistischen Analyseweg zur Unterscheidung verschiedener Immunzustände am Beispiel von *H.polygyrus*-infizierten Mäusen [22]. Dieser Analyseweg (siehe Abschnitt 1.5) wird in diesem Kapitel auf verschiedene Datensätze zur Diagnose von Infektionskrankheiten (Abschnitt 5.1), von Autoimmunerkrankheiten (Abschnitt 5.2) und von Krebs (Abschnitt 5.3) angewendet. Dabei wird die Diagnosemethode zunächst im Maussystem anhand neuer Datensätze nachvollzogen und validiert (Abschnitte 5.1 und 5.2). Darüber hinaus erfolgt erstmals die Anwendung auf einen humanen Datensatz, wobei mögliche Faktoren, die sich auf die Verlässlichkeit der serologischen Diagnose auswirken könnten, identifiziert und diskutiert werden (Abschnitt 5.3).

5.1 Unterscheidung der Antikörperbindungsprofile von gesunden und *H.polygyrus*- infizierten Mäusen

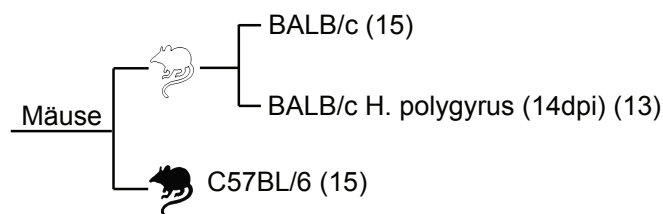


Abbildung 5.1: Seren gesunder und *H.polygyrus* infizierter Mäuse. Der untersuchte Datensatz besteht aus Seren von 15 gesunden C57BL/6 Mäusen, 15 gesunden BALB/c Mäusen und 13 BALB/c Mäusen, die mit dem intestinalen Fadenwurm *H.polygyrus* infiziert wurden. Den infizierten BALB/c Mäusen wurde 14 Tage nach Infektion Blut entnommen. Die Serumantikörperbindungsprofile von 15 gesunden C57BL/6 Mäusen und 15 gesunden BALB/c Mäusen zur Untersuchung der Unterschiede des Antikörperrepertoires verschiedener Mausstränge wurde analysiert. Außerdem wurden die Serumantikörperbindungsprofile von 15 gesunden BALB/c Mäusen sowie 13 infizierten BALB/c Mäusen (14 dpi) zur Unterscheidung des Immunzustandes untersucht.

Der Datensatz, der für die folgenden Untersuchungen verwendet wurde, besteht aus Seren von 15 gesunden C57BL/6 Mäusen, 15 gesunden BALB/c Mäusen sowie 13 BALB/c

Mäusen, die mit einem intestinalen Fadenwurm (*H.polygyrus*) infiziert wurden und denen nach 14 Tagen Blut entnommen wurde (Abb. 5.1).

Das IgG- und IgM-Antikörperbindungsprofil aller Serumproben wurde durch Inkubation jeder Probe auf Mikroarrays derselben Charge, die mit 300 Peptiden bedruckt sind (Peptidbibliothek P_{14+}^{300} , siehe Abschnitt 3.12), gemessen (Sequenzen siehe Tabelle 8, Anhang B). Die Detektion der IgG- bzw. IgM-Bindung erfolgte mit fluorochrommarkierten, isotypspezifischen Sekundärantikörpern (Signalintensitätshistogramme der IgG- und IgM-Bindungssignale siehe Abb. 7-12, Anhang B).

5.1.1 Merkmalsselektion und Klassifizierung von gesunden und *H.polygyrus*-infizierten Individuen

Die Klassifizierung der Antikörperbindungsprofile wurde für zwei Testdatensätze durchgeführt [20]. Zum einen wurden die IgG- und IgM-Antikörperrepertoires zweier verschiedener gesunder Mausstämmen (C57BL/6 und BALB/c) untersucht und zum anderen, die von gesunden und *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen, 14 Tage nach Infektion mit dem Parasiten. Mittels P-SVM wurden die Peptide selektiert, die die jeweiligen Gruppen am Besten klassifizieren. Die Sequenzen sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Bereits ein einziges Peptid genügt, um die IgM-Repertoires von gesunden C57BL/6 und BALB/c Mäusen zu klassifizieren (Tabelle 5.2). Aber auch die Antikörperrepertoires gesunder und infizierter BALB/c Mäuse sind fehlerfrei klassifizierbar.

Tabelle 5.1: Sequenzen der Peptide zur Klassifizierung der IgG- und IgM-Antikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und gesunden BALB/c Mäusen sowie zur Unterscheidung von gesunden BALB/c Mäusen und *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen. Die Peptide wurden durch Merkmalsselektion aus einer Zufallsbibliothek bestehend aus 300 Peptiden selektiert.

		Peptidsequenz
BALB/c vs. C57BL/6	IgM	SGFPDKIEFPTQDC
	IgG	VSLASSSARGDTYF
		QKDTSRKNNKEQGL
		KEEKSEEEHEGFRD
		TRRYNIMSKIFNTW
BALB/c vs. BALB/c <i>H.polygyrus</i> (14dpi)	IgM	THEDFRYDDVFEGN
		FFDEIIHSCRSQNG
		VRQVQRSKKMHKKG
	IgG	QQAIGKETTIELD
		ILDSIGRFFSGDRGAPKRG
		TRTTHYGSLPQKSQHGRD

Für alle untersuchten Gruppen wurde eine Klassifizierungsgenauigkeit (KG) zwischen 97% und 100% ermittelt. Die Signifikanz dieser Klassifizierungsergebnisse wurde durch *label shuffling* ermittelt. Wie in Tabelle 5.2 gezeigt wird, sind alle Klassifizierungen signifikant ($p < 0.05$).

Zusammengenommen benötigt man vier Peptide, um die IgM- Antikörperrepertoires bzw. sieben Peptide, um die IgG- Antikörperrepertoires aller untersuchten Gruppen zu klassifizieren. Zur Visualisierung werden diese 4- bzw. 7-dimensionalen Räume, die durch die vier bzw. sieben Peptide definiert werden, durch lineare Diskriminantenanalyse (LDA) auf zwei Dimensionen reduziert. Abb. 5.2 zeigt die Auftrennung aller Datenpunkte in drei Gruppen für das IgG- und IgM-Antikörperrepertoire.

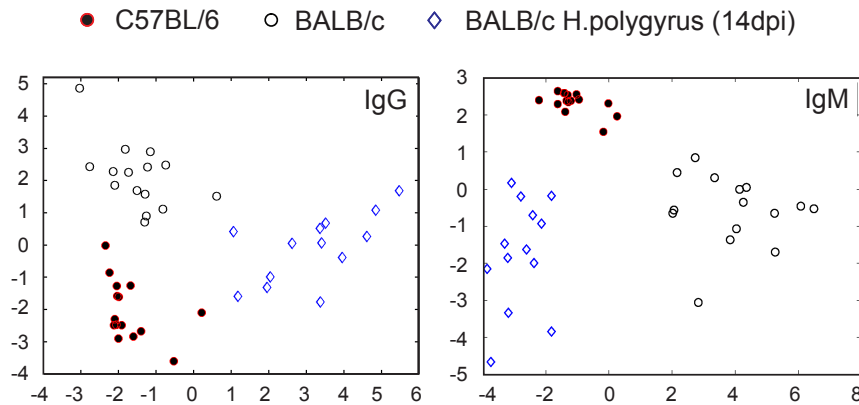


Abbildung 5.2: Lineare Diskriminantenanalyse (LDA) der IgG- und IgM-Antikörperbindungsprofile der beiden gesunden Mausstämmen C57BL/6 und Balb/c und der *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäuse unter Verwendung der durch P-SVM selektierten vier Peptide, um die IgM-Antikörperrepertoires bzw. sieben Peptide, um die IgG-Antikörperrepertoires aller untersuchten Gruppen zu klassifizieren. Entnommen aus Bongartz et al. [20].

5.1.2 Diagnose der *H.polygyrus*-Infektion

Die Diagnose einer Krankheit umfasst die Vorhersage der Gruppenzugehörigkeit eines Individuums aufgrund bestimmter, für die Krankheit charakteristischer Merkmale. Dies sollte nach Möglichkeit mit einem vom Trainingsdatensatz, mit dem diese Merkmale identifiziert wurden, unabhängigen Probensatz geschehen. Da wegen der geringen Anzahl von Serumproben, die Aufteilung in Trainings- und Validierungsdatensatz nicht möglich ist, wird stattdessen die diagnostische Zuverlässigkeit durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung bestimmt. Alle Gruppen lassen sich mit einer Genauigkeit von 97%-100% korrekt vorhersagen. Lediglich die Diagnose von *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen benötigt ein Peptid mehr als bei der Klassifizierung. Alle berechneten Ergebnisse sind signifikant ($p < 0.05$), was wiederum durch *label shuffling* bestimmt wurde. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

5.1.3 Bedeutung selektierter Peptide

Die sich stellende Frage ist, ob die gefundenen Peptide auf natürliche Antigene zurückzuführen sind. Daher wurden die Sequenzen der Peptide, die zur Klassifizierung von gesunden und *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen (14 dpi) selektiert wurden, gegen eine Proteinsequenzdatenbank verglichen (BLAST) [3, 4]. Als Ergebnis liefert BLAST

lokale Abgleiche von Teilen der gesuchten Sequenz mit Teilen aus der Datenbank und gibt zuzüglich die Signifikanz der gefundenen Treffer an.

Die Sequenzen der selektierten Zufallspeptide konnten nicht signifikant auf ein bekanntes Protein zurückgeführt werden (siehe Tabelle 5, Anhang A).

Tabelle 5.2: Klassifizierung und Vorhersage der IgG- und IgM-Antikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und gesunden BALB/c Mäusen sowie von gesunden BALB/c Mäusen und *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen (14 dpi). Die Klassifizierungsgenauigkeit (KG) der durch P-SVM selektierten Peptide, die durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung bestimmte diagnostische Zuverlässigkeit (DZ), sowie die durch *label shuffling* berechneten Signifikanzen p sind gezeigt.

	BALB/c vs. C57BL/6		BALB/c vs. BALB/c H.polygyrus (14dpi)	
	IgM	IgG	IgM	IgG
KG	100%	97%	100%	100%
Peptidanzahl	1	4	3	3
p	<0.002	<0.031	0.002	<0.002
DZ	100%	97%	100%	100%
Peptidanzahl	1	4	4	3
p	<0.002	<0.006	<0.001	<0.006

5.2 Unterscheidung der Antikörper-Bindungsprofile von gesunden und autoimmunen Mäusen

Da die Diagnose von SLE sowohl aufgrund der Uniformität der Symptome mit anderen Autoimmunkrankheiten, als auch durch das Fehlen spezifischer Autoantigenmarker [39], problematisch ist, werden die Bindungsprofile von IgG2b- und IgG2c-Autoantikörpern gegenüber zufälligen Peptiden zur Diagnose herangezogen.

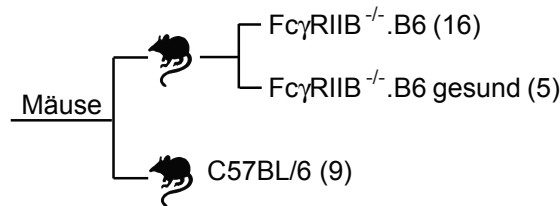


Abbildung 5.3: Seren gesunder und autoimmuner Mäuse. Seren von 9 gesunden C57BL/6 Mäusen, 16 kranken $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen (Blutabnahme im Alter von 28 Wochen) sowie von 5 gesunden $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen (Blutabnahme im Alter von 18 Wochen), wurden auf Mikroarrays, auf denen die Zufallsbibliothek P_{14+}^{300} immobilisiert war, inkubiert. Die IgG2b- und IgG2c-Antikörperbindungsprofile wurden mit fluorochrommarkierten Sekundärantikörpern detektiert und die Unterschiede der Antikörper-repertoires von gesunden und autoimmunen Mäusen analysiert.

Dazu wurden die IgG2b und IgG2c-Autoantikörperrepertoires von neun gesunden C57BL/6 Mäusen sowie von 16 kranken $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen (Abb. 5.3) anhand ihrer Bindungsprofile gegenüber 300 Peptiden (Peptidbibliothek P_{14+}^{300} , siehe Abschnitt 3.12) untersucht. Die Inkubation der Seren erfolgte auf Mikroarrays derselben Produktionscharge, am selben Tag und zu konstanten experimentellen Bedingungen. Die Detektion einer IgG2b- und IgG2c-Peptid-Interaktionen erfolgte mithilfe von isotypspezifischen Sekundärantikörpern (Signalintensitätshistogramme der IgG2b- und IgG2c-Bindungssignale siehe Abb.13 und 14, Anhang B). Falschpositive Signale, die von unspezifischer Sekundärantikörperbindung an die Peptide auf dem Mikroarray herrühren, wurden, wie in Abschnitt 3.15.1 beschrieben, entfernt. Für die Analyse des IgG2b-Antikörperrepertoires blieben dementsprechend 242 Peptide (siehe Tabelle 9, Anhang B) übrig und für die Analyse des IgG2c-Antikörperrepertoires wurden 233 Peptide (siehe Tabelle 10, Anhang B) verwendet. Zur Unterscheidung der Antikörperbindungsprofile von gesunden und autoimmunen Individuen wurde der beschriebene Analyseweg (Abb. 1.5) verfolgt.

5.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (Abb. 5.4) zeigt eine sehr gute Auftrennung der beiden Mausgruppen. Die ersten Hauptkomponenten enthalten jeweils 43.01% (IgG2b) bzw. 58.94% (IgG2c) und die zweiten Hauptkomponenten 11.16% (IgG2b) und 7.45% (IgG2c) der Varianz.

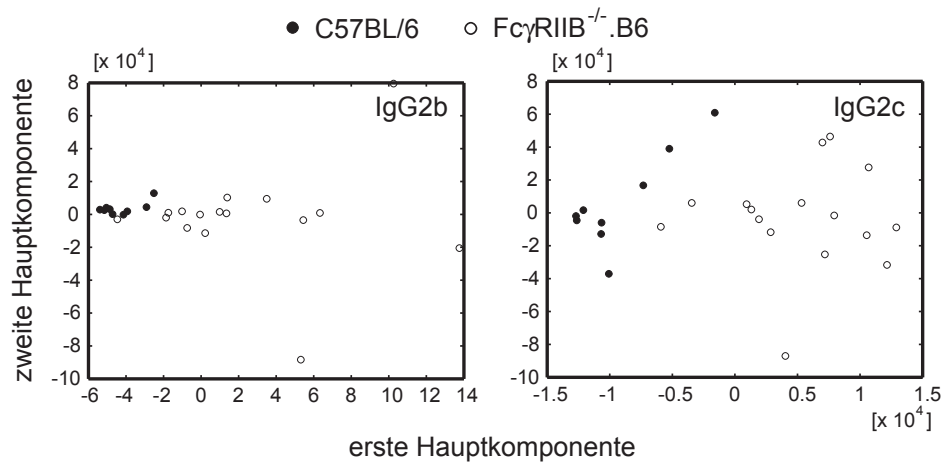


Abbildung 5.4: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der IgG2b- und IgG2c- Antikörperbindungssignale der auf Mikroarrays inkubierten Seren von 9 gesunden C57BL/6 und 16 Fc γ RIIB^{-/-}.B6 Mäusen. Die ersten zwei Hauptkomponenten sind gegeneinander aufgetragen. Diese entsprechen 242- (IgG2b) bzw. 233- (IgG2c) dimensional Vektoren, die aus den 242 (IgG2b) bzw. 233 peptidassoziierten Signalintensitäten hervorgehen. Die Anzahl der Peptide resultieren aus der unterschiedlichen Anzahl falschpositiver Signale, die die verschiedenen Sekundärantikörper hervorrufen.

5.2.2 Diagnose von Autoimmunkrankheiten anhand spezifischer Biomarker

Da durch Hauptkomponentenanalyse keine spezifischen Merkmale aus einem Datensatz extrahiert werden können, wird der Algorithmus P-SVM zur Merkmalsselektion herangezogen, um Peptide zu identifizieren, die als sogenannte Biomarker für eine Autoimmunkrankheit (hier im SLE-Mausmodell) dienen könnten.

Mit nur drei Peptiden lassen sich die IgG2b- und IgG2c-Antikörperrepertoires von gesunden und SLE-Mäusen fehlerfrei klassifizieren ($p_{IgG2b} = 0.08$, $p_{IgG2c} = 0.07$) (Tabelle 5.3). Mögliche Gründe für die nicht sehr hohe Signifikanz der Ergebnisse werden in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Die diagnostische Zuverlässigkeit wurde durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung bestimmt. Mit jeweils drei Peptiden lassen sich gesunde und autoimmune Mäuse anhand der IgG2b- und IgG2c-Bindungsprofile mit 94% diagnostischer Zuverlässigkeit vorhersagen. Durch *label shuffling* wurde gezeigt, dass sich die ermittelten Vorhersagegenauigkeiten signifikant von denen zufällig vorhergesagter Gruppen unterscheiden ($p_{IgG2b} = 0.002$, $p_{IgG2c} = 0.007$) (Tabelle 5.3). Tabelle 5.4 zeigt die Sequenzen der selektierten Peptide.

Die 3-dimensionale Auftragung der Signalintensitäten der drei durch Merkmalsselektion gefundenen Peptide gegeneinander veranschaulicht die Auftrennung der beiden Mausgruppen (Abb. 5.5).

Tabelle 5.3: Klassifizierung und Vorhersage der IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und autoimmunen $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen. Die Klassifizierungsgenauigkeit (KG) wurde durch Merkmalsselektion bestimmt. Die Sensitivität, Spezifität und die diagnostische Zuverlässigkeit (DZ) wurden durch *leave-one-out*-Kreuzvalidierung bestimmt. Die Signifikanzen p wurden durch *label shuffling* berechnet.

C57BL/6 vs. $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6		
	IgG2b	IgG2c
KG (%)	100	100
p	0.08	0.07
Sensitivität	1	1
Spezifität	0.88	0.88
DZ (%)	93.8	93.8
p	0.002	0.007
Peptidanzahl	3	3

Tabelle 5.4: Sequenzen der Peptide zur Klassifizierung der IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und autoimmunen $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen. Die Peptide wurden durch Merkmalsselektion aus der Zufallsbibliothek P_{14+}^{300} selektiert.

Peptidsequenz		
IgG2b	1	KDQDAEQAPEYRGRTTELLKE
	2	STDDYEDAASQGTE
	3	FKTRVQDGSPWKTA
IgG2c	1	SITSFQDMRAPTSQ
	2	KTNYTNTAKNVKSI
	3	RSPQDMLTGFWLAH

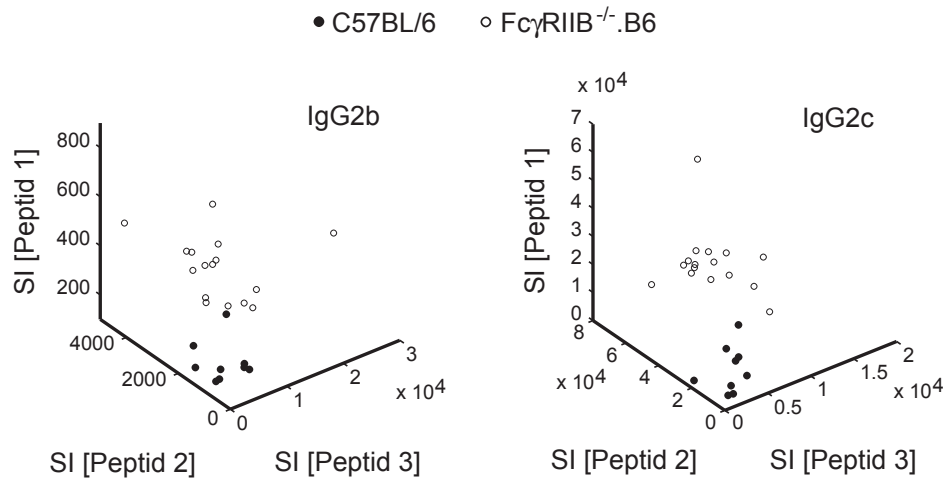


Abbildung 5.5: Signalintensitäten der drei durch Merkmalsselektion gefundenen Peptide für alle Individuen der beiden Mausgruppen (C57BL/6 und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6). Die selektierten Peptide erlauben die Klassifizierung von gesunden und autoimmunen Mausgruppen im IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperrepertoire.

5.2.3 Auftrennung von gesunden und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen aufgrund genetischer oder immunologischer Unterschiede?

Eine mögliche Interpretation der klaren Klassifizierbarkeit der IgG2b- und IgG2c- Antikörperbindungsmuster wäre, dass die $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäuse aufgrund der genetischen Modifikationen, ein anderes Antikörperrepertoire aufweisen, als die gesunden C57BL/6 Mäuse. Um sicherzustellen, dass die unterschiedlichen Antikörperbindungsprofile von gesunden und autoimmunen Mäusen auf die Antikörperrepertoireveränderungen als Folge der Autoimmunkrankheit und nicht auf die genetischen Unterschiede zurückzuführen sind, wurden die IgG2b- und IgG2c-Antikörperbindungsprofile von $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen analysiert, die noch keine Symptome der Autoimmunkrankheit zeigten und mit denen von $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen, die SLE Symptome zeigten, und gesunden C57BL/6-Mäusen verglichen.

In $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen treten die ersten SLE Symptome im Alter von 20 Wochen auf. Von fünf Mäusen wurde im Alter von 18 Wochen (gesund) und 28 Wochen (krank) Blut entnommen. Diese 10 Serumproben wurden zusammen mit weiteren 5 Serumproben von gesunden C57BL/6 Mäusen auf Mikroarrays derselben Charge, am gleichen Tag inkubiert und die IgG2b- und IgG2c-Antikörperbindungsprofile analysiert.

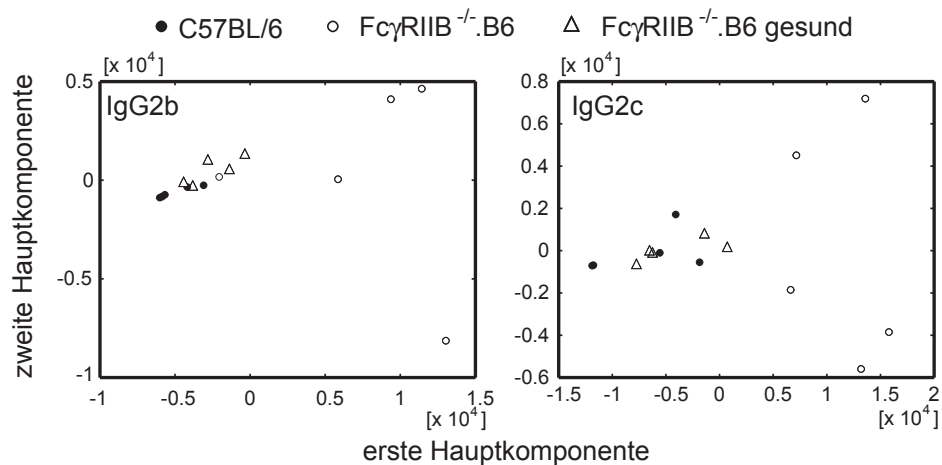


Abbildung 5.6: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperbindungssignale der auf Mikroarrays inkubierten Seren fünf gesunder C57BL/6 sowie fünf gesunder und fünf kranker $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäuse. Die ersten zwei Hauptkomponenten sind gegeneinander aufgetragen.

Durch Hauptkomponentenanalyse wird gezeigt, dass die gesunden $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäuse sich nicht von den gesunden C57BL/6 Mäusen unterscheiden, sich jedoch die kranken $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäuse von den gesunden Mäusen auftrennen lassen (Abb. 5.6). Daraus wird geschlussfolgert, dass die Auftrennung aus den Unterschieden der Antikörperbindungsprofile, die die Autoimmunkrankheit hervorruft, resultieren und die genetischen Unterschiede der Mäuse keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

5.2.4 Bedeutung selektierter Peptide

In diesem Abschnitt wird untersucht, ob die gefundenen Peptide auf natürliche Antigene zurückzuführen sind. Daher wurden die Sequenzen der Peptide, die zur Klassifizierung von gesunden und $Fc\gamma RIIB^{-/-}$.B6-Mäusen selektiert wurden, gegen eine Proteinsequenzdatenbank verglichen (BLAST) [3, 4]. Als Ergebnis liefert BLAST lokale Abgleiche von Teilen der gesuchten Sequenz mit Teilen aus der Datenbank und gibt zuzüglich die Signifikanz der gefundenen Treffer an.

Die Sequenzen der selektierten Zufallspeptide konnten nicht signifikant auf ein bekanntes Protein zurückgeführt werden (siehe Tabelle 5, Anhang A).

5.3 Unterscheidung von Serumantikörperbindungsprofilen zur Diagnose primärer Hirntumore

Die Bestimmung des Malignitätsgrades humaner Astrozytome erfordert hoch-invasive Verfahren. In diesem Abschnitt wird erstmals im humanen System untersucht, ob anhand der IgM-Antikörperbindungsprofile gegenüber Zufallspeptidbibliotheken die Diagnose des Malignitätsgrades humaner Astrozytome zu bewerkstelligen ist. Da schon eine humorale Immunantwort auf Gliome im Mausmodell [105] und bei humanen Intrakranialtumoren [30] beobachtet werden konnte, kann die Antikörperrepertoireänderung aufgrund des Hirntumors zur serologischen Diagnose des Tumorgrades herangezogen werden.

5.3.1 Patienten und experimenteller Aufbau

Die Seren von 8 niedriggradigen (WHO Grade I und II) Astrozytom Patienten (nA) und 24 hochgradigen (WHO Grade III und IV) Astrozytom Patienten (hA) wurden hinsichtlich der Bindungsprofile ihrer IgM-Antikörperrepertoires gegenüber Zufallspeptidbibliotheken untersucht (Abb. 5.7).

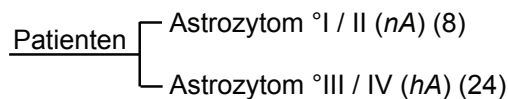


Abbildung 5.7: Seren von niedriggradigen (nA , 8 Proben) und hochgradigen (hA , 24 Proben) Astrozytom Patienten. Die Malignitätsgrade der Tumore wurden durch histologische Analyse von Tumorgewebe bestimmt. Die Blutabnahme erfolgte vor oder während der operativen Tumoresektion. Es wurden ausschließlich Patienten mit primären Tumoren in der Studie berücksichtigt. Die Bindungsprofile der IgM-Antikörperrepertoires aller Proben gegenüber Zufallspeptidbibliotheken wurden analysiert.

Die Seren wurden von Christian Schichor (Neurologischen Klinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor oder während der operativen Resektion des Tumors, aber immer vor einer weiteren medikamentösen Behandlung oder Radiotherapie der Patienten. Einige Patienten wurden 1-2 Tage vor der Operation mit Kortison behandelt. Um eine sekundäre Immunantwort auf einen rezidiven Tumor auszuschließen, wurden ausschließlich Patienten mit primären Tumoren in der Studie berücksichtigt. Die Malignitätsgrade der Tumore wurde durch histologische Analyse von Tumorgewebe bestimmt.

Die Seren wurden auf Mikroarrays, die mit der Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ (siehe Abschnitt 3.12) bedruckt sind, inkubiert und die IgM-Bindungssignale mit einem fluorochrommarkierten anti-Human-IgM Sekundärantikörper detektiert (Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale siehe Abb. 15 und 16, Anhang B). Die Inkubation der Seren erfolgte auf Mikroarrays derselben Produktionscharge, am selben Tag und zu konstanten experimentellen Bedingungen. IgG-Bindung wurde nicht detektiert, da eine

Kreuzreaktivität des anti-IgG Sekundärantikörpers mit anti-IgM nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 4.2.1). Es wurden nur IgM-Bindungen an 15mer Zufallspeptide für die weitere Analyse berücksichtigt, da wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, die sich ebenfalls auf diesem Mikroarraytyp befindenden 13mer Zufallspeptide und 15mer Peptide mit S, T oder Y in Position acht der Peptidsequenz, unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen. Falschpositive Signale, die von Bindung des Sekundärantikörpers an die Peptidbibliothek resultieren wurden, wie beschrieben (Abschnitt 4.2.2), eliminiert. Für die Datenanalyse standen danach die Bindungssignale von 3282 Peptiden zur Verfügung.

5.3.2 Dateneigenschaften

Die Verteilung der Signalintensitäten entspricht einer Lognormalverteilung, was durch Gauss-Fit der logarithmierten Signalintensitäten jedes Individuums ($\mu = 3.7$ ($3.2 - 4.4$), $\sigma = 0.20$ ($0.10 - 0.27$), $r^2 = 0.95$ ($0.87 - 0.98$)) (siehe Tabelle 4, Anhang A) und durch Vergleich gegen eine Standardnormalverteilung in Quantil-Quantil-Diagrammen bestimmt wurde.

Betrachtet und vergleicht man die Signalintensitäten zwischen den Gruppen nA und hA , so fällt auf, dass die Erkennung der Peptide sich in den Gruppen nicht sehr unterscheidet. Abb. 5.8-A zeigt die über alle Individuen einer Gruppe gemittelten Signalintensitäten für jedes der 3282 Peptide. Die Signalintensitäten wurden der Größe nach innerhalb der Gruppe nA geordnet und gegen den Peptidindex aufgetragen. Peptide, die von niedriggradigen Astrozytompatienten schwach erkannt werden, zeigen auch in der hochgradigen Astrozytom-Gruppe eine geringe Signalintensität. Andersherum werden einige Peptide von beiden Gruppen mit gleichermaßen hoher Affinität gebunden.

Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Signalintensitäten der hA -Gruppe im Mittel niedriger sind als die der nA -Gruppe. Jedoch zeigt Abb. 5.8-B, dass die Mittelwerte der Signalintensitäten über alle Peptide innerhalb der einzelnen Gruppen stark streuen, d.h., dass die Gruppen nicht allein aufgrund ihrer Signalintensitätsunterschiede klassifizierbar sind.

Die große Varianz in den Daten wird außerdem dadurch deutlich, dass obwohl die Peptiderkennung in den Gruppen ähnlich ist, die Signalintensitäten zwischen den einzelnen Individuen nur mäßig korrelieren ($r^2 = 0.59$), im Gegensatz zu durchgeführten Wiederholungsinkubationen eines humanen Kontrollserums, die gut reproduzierbare Signalintensitäten aufweisen ($r^2 = 0.88$) (Abb. 5.8-C). Auch innerhalb jeder Gruppe korrelieren die Signalintensitäten individueller Messungen nur schwach ($r_{nA}^2 = 0.59$, $r_{hA}^2 = 0.59$). Demzufolge ist die biologische Varianz, die sich aus den genetischen und immunologischen Unterschieden der einzelnen Individuen ergibt viel größer als die technologische Varianz aufgrund experimenteller Einflussfaktoren.

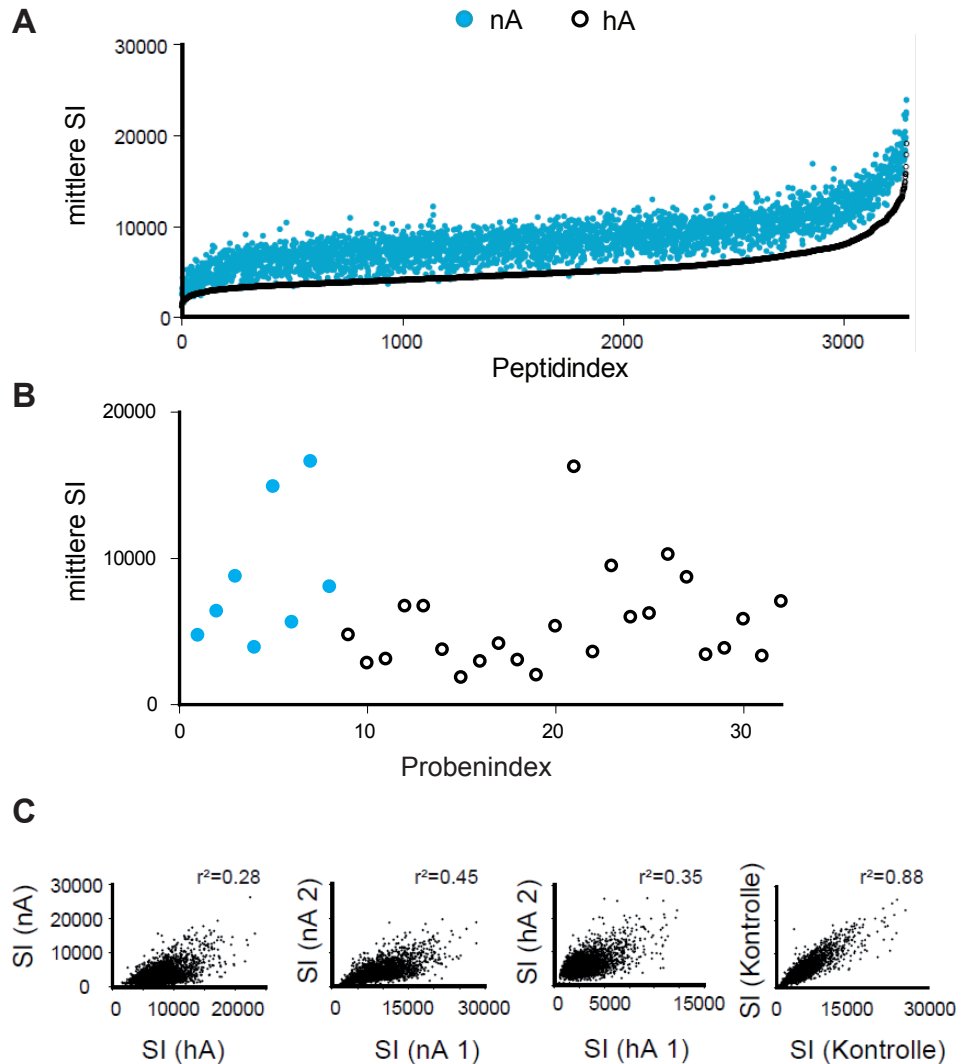


Abbildung 5.8: Eigenschaften der IgM-Bindungssignalintensitäten von *nA*- und *hA*- Individuen. **A:** Die über alle Individuen einer Gruppe gemittelten Signalintensitäten für jedes der 3282 Peptide wurden der Größe nach innerhalb der Gruppe *nA* geordnet und gegen den Peptidindex aufgetragen. **B:** Die über den Mikroarray gemittelte Signalintensität jeder Serumprobe (8 *nA*, 24 *hA*). Die Streuung der Mittelwerte ist größer als die Differenzen zwischen den Gruppen. **C:** Korrelation der mittleren Signalintensitäten einzelner Individuen innerhalb und zwischen den Patientengruppen (repräsentative Beispiele). Als Vergleich sind die gut korrelierenden Signalintensitäten der Inkubationsrepetition eines humanen Kontrollserums gezeigt (unten rechts).

5.3.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (Abb. 5.9) zeigt keine Auftrennung der IgM-Antikörperbindungssignale zwischen den Gruppen *nA* und *hA* mit den beiden ersten Hauptkomponenten, d.h. die Gruppen sind nicht aufgrund ihrer größten Varianzen klassifizierbar.

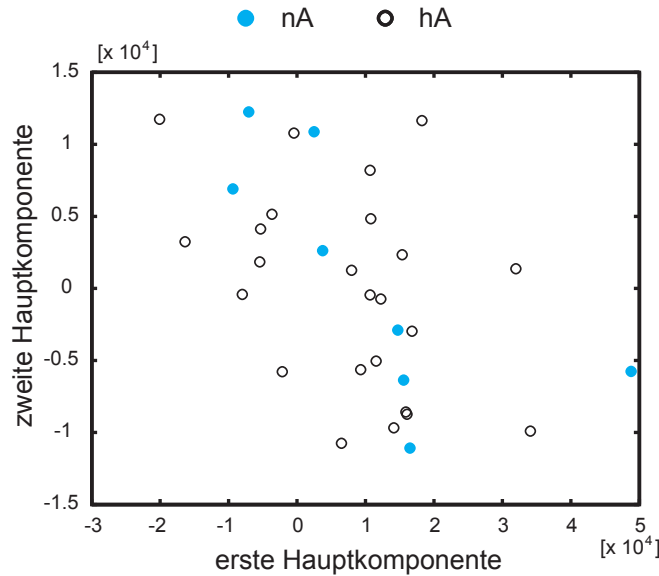


Abbildung 5.9: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der IgM-Antikörperbindungssignale an 3282 Peptide von Seren 8 niedriggradiger Astrozytom- (*nA*) und 24 hochgradiger Astrozytom- (*hA*) Patienten. Die ersten zwei Hauptkomponenten sind gegeneinander aufgetragen.

5.3.4 Bestimmung des Grades primärer Hirntumore

Zur Bestimmung des Grades primärer Astrozytome wurden die IgM-Antikörper-Bindungsprofile von 8 niedriggradigen Astrozytom- (*nA*) und 24 hochgradigen Astrozytom- (*hA*) Patienten analysiert. Mit P-SVM wurden Merkmale selektiert, die die Unterschiede zwischen den Gruppen charakterisieren und so zu einer Auftrennung führen (Tabelle 5.5). Die Merkmalsselektion wurde unter Verwendung aller 3282 Peptid-assoziierten Signalintensitäten durchgeführt. Die Sensitivität und Spezifität wurden mit den Gleichungen 3.2 und 3.3 berechnet. Die diagnostische Zuverlässigkeit (DZ) wurde durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung bestimmt (siehe Abschnitt 3.16).

Die Tumorgrade *nA* und *hA* können mit einer diagnostischen Zuverlässigkeit von 83% vorhergesagt werden. Dass diese Ergebnisse nicht zufällig sind, wurde durch 1000-maliges *label shuffling* überprüft. Der erhaltene p-Wert spiegelt die hohe Signifikanz der Ergebnisse wider (siehe Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Klassifizierung der IgM-Antikörperrepertoires von niedriggradigen Astrozytom- (*nA*) und hochgradigen Astrozytom- (*hA*) Patienten. Die Sensitivität, Spezifität und die diagnostische Zuverlässigkeit (DZ) wurden durch *leave-one-out* Kreuzvalidierung bestimmt. Die Signifikanz *p* wurden mittels *label shuffling* berechnet.

	<i>nA</i> vs. <i>hA</i>
Sensitivität	0.79
Spezifität	0.88
Diagnostische Zuverlässigkeit	83%
Signifikanz <i>p</i>	0.009

5.4 Diskussion

Für alle drei untersuchten Krankheiten konnte die serologische Diagnose erfolgreich durchgeführt werden.

Diagnose der *H.polygyrus*-Infektion im Mausmodell

Bereits ein einziges Peptid genügt, um die IgM-Repertoires von gesunden C57BL/6 und BALB/c Mäusen zu klassifizieren (Abschnitt 5.1). Vermutlich sind die natürlichen Antikörperrepertoires von Mäusen zweier Stämme aufgrund ihrer genetischen Unterschiede so verschieden, dass ein einziges Peptid genügt, um diese Unterschiede zu erfassen. Aber auch die IgG- und IgM- Antikörperrepertoires gesunder und *H.polygyrus*-infizierter BALB/c Mäuse sind fehlerfrei klassifizierbar und die Infektion mit sehr hoher Sicherheit diagnostizierbar, was auf die Änderung der Antikörperrepertoires aufgrund der Infektion zurückzuführen ist.

Dass eine *H.polygyrus*-Infektion sich auf den IgG1-Antikörpertiter auswirkt, wurde bereits gezeigt [8, 14]. Außerdem wurden IgA- und IgE- Antworten auf eine *H.polygyrus*-Infektion beschrieben [13, 14]. Eine Änderung des IgM-Antikörperrepertoires als Folge der Infektion mit *H.polygyrus* wurde erstmals durch die Untersuchung von Serumproben infizierter Mäuse mit Zufallspeptid-Mikroarrays beobachtet [22].

Unsicherheiten rühren daher, dass IgG und IgM bei der Diagnose einer *H.polygyrus*-Infektion in Mäusen simultan detektiert wurden. N. Bruni hat in ihrer Arbeit [22] *H.polygyrus*-infizierte BALB/c Mäuse zu einem frühen (10 und 14 dpi) und späten (18 dpi) Zeitpunkt nach der Infektion diagnostiziert. Dass die dort identifizierten klassifizierenden Peptide zum Teil für das IgM- und das IgG- Antikörperrepertoire identisch waren, deutet darauf hin, dass eine Sekundärantikörper-Kreuzreaktivität dafür ursächlich ist. Zwar wurden im hier untersuchten System für das IgG- und IgM- Antikörperrepertoire verschiedene Peptide als Klassifikatoren identifiziert, jedoch wurde eine Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper nicht ausgeschlossen.

Diagnose von SLE im Mausmodell

Auch für den zweiten Testdatensatz gelang durch Merkmalsselektion die fehlerfreie Klassifizierung von gesunden und autoimmunen Mäusen (Abschnitt 5.2). Dass die Signifikanzen der Ergebnisse nicht sehr hoch sind, hängt mit der kleinen Serumprobenanzahl zusammen. Nur neun Serumproben von gesunden C57BL/6-Mäusen sind nicht genug, um signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu identifizieren, da die Varianz der Signalintensitäten zwischen Individuen innerhalb der Gruppen zu groß ist.

Die begrenzte Verfügbarkeit biologischer Proben ist häufig der limitierende Faktor derartiger Studien. Die Probenzahl wirkt sich auf die Effizienz von Klassifikationsmethoden und Merkmalsselektion aus [160]. Je größer die Probenanzahl, desto zuverlässigere Ergebnisse werden erzielt.

Im Gegensatz zur Merkmalsselektion, die nur einmal für den gesamten Datensatz durchgeführt wird, spielt bei der *leave-one-out* Kreuzvalidierung, die zur Diagnose verwendet wird, die Gruppengröße eine kleinere Rolle. Wie beschrieben (Abschnitt 3.16.6)

wird *leave-one-out* Kreuzvalidierung für alle Datenpunkte durchgeführt, und kann daher durch die häufigen Wiederholungen diese Diskrepanzen ausgleichen, wodurch sich die Signifikanz der diagnostischen Zuverlässigkeit vergrößert.

In Abschnitt 5.2.3 wird der Frage nachgegangen, ob die Auftrennung von gesunden und autoimmunen Mäusen auf die genetischen oder immunologischen Unterschiede der Mausgruppen zurückzuführen ist. Aus den Analysen wird geschlussfolgert, dass die Auftrennung der gesunden und kranken Gruppen aus den Unterschieden der Antikörperbindungsprofile, die die Autoimmunkrankheit hervorruft, resultieren und die genetischen Unterschiede der Mäuse keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Allerdings konnte die Analyse nur mittels Hauptkomponentenanalyse durchgeführt werden. Die Schlussfolgerung müsste dahingehend abgesichert werden, dass die Auftrennung von gesunden $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 und C57BL/6 Mäusen auch mit keiner anderen Methode, wie z.B. Merkmalsselektion möglich ist. Allerdings konnte Merkmalsselektion an diesem Beispieldatensatz nicht durchgeführt werden, da die Gruppengrößen mit jeweils fünf Individuen zu klein sind [160].

Diagnose von humanen Astrozytomen

Im humanen System erfolgte die Diagnose von Astrozytomen für die zwei Patientengruppen (*nA*, *hA*) mit einer Zuverlässigkeit von 83% (Abschnitt 5.3). Verglichen mit denen anhand von Mausmodellen erhaltenen diagnostischen Zuverlässigkeiten (Abschnitte 5.1 und 5.2), erscheint dieser Wert gering, jedoch erfolgt die Analyse humaner Antikörperrepertoires unter ganz anderen Voraussetzungen. Bei Mäusen, die für solche Studien verwendet werden, handelt es sich um Inzuchtstämme, die genetisch ähnlich sind. Außerdem werden sie unter keimfreien Bedingungen gehalten. Infolgedessen wird angenommen, dass deren Antikörperrepertoires nicht derart verschieden sind, wie die individuell verschiedener Menschen. Dass die humanen Antikörperrepertoireunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen nicht größer sein können als die zwischen einzelnen Individuen, wurde bereits dadurch gezeigt, dass die Gruppen durch Hauptkomponentenanalyse nicht klassifizierbar sind (Abschnitt 5.3.3). Umso bemerkenswerter ist, dass in diesem heterogenen Datensatz überhaupt Klassifikatoren gefunden werden, was erstmals im humanen System gezeigt werden konnte.

Dass die Klassifizierung von *nA*- und *hA*- Individuen nicht mit höherer Zuverlässigkeit zu bewerkstelligen ist, könnte mit der mit nur 8 Individuen kleinen Gruppengröße der *nA*-Patienten zusammenhängen. Da die Varianz der Signalintensitäten zwischen den einzelnen Individuen innerhalb einer Gruppe schon sehr groß ist (Abb. 5.8-B), benötigt man eine möglichst große Anzahl an Patientenseren, um die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant detektieren zu können [47, 160].

Zuverlässigkeit der Merkmalsselektion als Diagnostikmethode

Dessen ungeachtet bleibt die Frage nach der Zuverlässigkeit dieser Diagnosemethode offen. Eine verlässliche Diagnosemethode sollte ausschließlich auf anderen verlässlichen Methoden aufbauen. Ein Maß für die Zuverlässigkeit einer Methode ist ihre Reproduzierbarkeit. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten ein-

zelter Wiederholungsmessungen bestimmt. Dass diese sehr gut ist, beweist allerdings noch nicht, dass die Diagnose einer Krankheit für eine Serumprobe reproduzierbar ist. Dazu müssten alle Seren einer Studie in einem identischen Wiederholungsexperiment inkubiert und analysiert werden, was dadurch erschwert wird, dass die Lieferbarkeit von Glasträgern mit identischen Merkmalen noch immer mit Schwierigkeiten verbunden ist, vor allem was die Unterschiede zwischen einzelnen Produktionschargen betrifft.

Zur endgültigen Validierung bedarf es weiterer, vor allem unabhängiger Untersuchungen. Generell sollte eine Diagnosemethode mit einem Trainingsdatensatz entwickelt und dann mit einem unabhängigen Validierungsdatensatz überprüft werden. Ein kritischer Punkt ist, dass *leave-one-out* Kreuzvalidierung keine echte Validierungsmethode darstellt, da sie nicht unabhängig vom Trainingsdatensatz ist. Eine Validierung mit einem unabhängigen Datensatz, umfasst die Inkubation neuer Serumproben und die anschließende Vorhersage des Krankheitszustandes anhand des entwickelten Modells. Auch hier stellt die mangelnde Vergleichbarkeit von Signalintensitätsmessungen auf verschiedenen Produktionschargen die größte Schwierigkeit dar. Die Größe einer Mikroarrayproduktionscharge ist durch die Kapazität des Druckroboters begrenzt, daher können auch nicht beliebig viele Seren in einer Studie untersucht werden, da diese unbedingt auf einer Produktionscharge durchgeführt werden sollte.

Eine weitere Möglichkeit, um die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wäre die Ergebnisse mit einer anderen Analysemethode zu kontrollieren. So könnten beispielsweise ELISA- oder SPR-Messungen unter Verwendung der durch P-SVM selektierten Peptide durchgeführt werden. SPR wurde schon erfolgreich zur serologischen Diagnose von Zecken-Borreliose angewendet [106]. Jedoch ist die Anwendung zur serologischen Diagnose nicht trivial. Das Hauptproblem ist die unspezifische Bindung von Blutserumkomponenten an die Sensoroberfläche. Dies wirkt sich entscheidend auf die Sensitivität der Messmethode aus. Die Anwendung für das hier verwendete System würden sich demnach als schwierig gestalten, da eine hohe Sensitivität eine Voraussetzung für die Messung mit Zufallspeptiden ist.

Der Vergleich der Methode mit dem Goldstandard scheitert, da die Mikroarray-Technologie noch nicht standardisiert für klinische Tests verwendet wird. Zwar gibt es etliche Studien, in denen Protein- und Peptid-Mikroarrays zur Identifizierung von Biomarkern und zur Diagnose verwendet werden [11, 28, 41, 67, 79, 102, 125, 133, 165], doch stellen sich von den unzähligen gefundenen Biomarkern letztlich nur wenige als klinisch relevant oder gar reproduzierbar heraus [127].

Des Weiteren stellt sich die Frage nach der Relevanz der gefundenen Biomarker. Da die selektierten Peptide in keinem der untersuchten Fälle auf bekannte Proteine zurückgeführt werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass diese biologisch nicht relevant sind. Jedoch können diese Ergebnisse auch so interpretiert werden, dass sogenannte Biomarker, die in den letzten Jahren sehr zahlreich durch Hochdurchsatzmethoden für viele verschiedene Krankheiten identifiziert wurden, gar nicht biologisch relevant sein müssen. In einem in-vitro Experiment können sie zwar als diagnostische Marker fungieren, jedoch bedeutet dies nicht, dass sie eine funktionelle Bedeutung im lebenden Organismus haben. Andererseits ist, selbst bei der enormen Größe des Proteoms, eine Sequenzidentität von Teilen natürlicher Proteine mit zufällig generierten Peptiden äußerst unwahrscheinlich,

zumal das Proteom noch lange nicht vollständig identifiziert ist. Daher kann über die Relevanz der selektierten Biomarker keine Aussage getroffen werden. Vielleicht wäre die Suche nach Proteinteilen, die die Ähnlichkeiten von Aminosäuren berücksichtigt hier sinnvoll und erfolgversprechender [162].

Die Verwendung unvoreingenommener Zufallspeptidbibliotheken bietet dennoch viele Vorteile. Serumantikörperbindungsmessungen können unabhängig von Vorwissen über Antigene durchgeführt werden. Außerdem decken zufällig generierte Peptide einen großen Sequenzraum ab und besitzen daher eine viel größere Diversität und somit viel breitere Anwendbarkeit als eine Antigenbibliothek.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Optimierung der Peptid-Mikroarray-Technologie für qualitative und quantitative Antikörper-Bindungsstudien. Da Peptid- und Protein-Mikroarrays aufgrund ihrer Komplexität bisher noch nicht als standardisierte Methode gelten, war es von enormer Wichtigkeit, die Eigenschaften, die diese Technologie charakterisieren, zu ergründen und ein experimentelles Protokoll zu entwickeln, das die verlässliche Messung von Antikörper-Peptid-Interaktionen ermöglicht, mit dem Ziel der Entwicklung einer nicht-invasiven serologischen Diagnosemethode.

Verlässlichkeit von Mikroarray-Bindungsstudien

Die Peptid-Mikroarray Technologie wurde erstmalig hinsichtlich der Präzision und Zuverlässigkeit von Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen statistisch analysiert. Die technologische Genauigkeit von Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen wurde anhand der Variabilität der Bindungssignalintensitäten, die innerhalb von Mikroarrays gemessen wurden, für vier verschiedene Glasträgertypen bestimmt. Ein über alle Datensätze mittlerer Variationskoeffizient von 0.28 wurde berechnet, welcher einen repräsentativen Wert für die Antikörper-Peptid-Bindungsmessung auf Mikroarrays widerspiegelt. Der relative Fehler der Signalintensitätsmessung war besonders für kleine Signalintensitäten zum Teil sehr hoch. Doch da diese Signalintensitäten sich kaum vom Hintergrundrauschen unterscheiden und daher für die Datenanalyse unberücksichtigt bleiben, hat diese große Variation auch keinen Einfluss auf die Ergebnisse qualitativer und quantitativer Bindungsstudien. Die Qualität der Signalintensitätsmessung ist für die verschiedenen Glasträger vergleichbar gut.

Des Weiteren wurde die Reproduzierbarkeit der Bindungssignalintensitäten, die auf verschiedenen Mikroarrays gemessen wurden, für vier verschiedene Glasträgertypen untersucht. Die absoluten Signalintensitäten, die aus unabhängigen Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen auf verschiedenen Mikroarrays resultieren, korrelieren sehr gut ($r^2 = 0.94$). Einschränkungen ergeben sich bei Messungen, die auf verschiedenen Mikroarraychargen durchgeführt wurden. Hier zeigt sich ein Abstand der Signalintensitäten zwischen verschiedenen Mikroarrays, der einer direkten Vergleichbarkeit von Signalintensitäten entgegensteht.

Weiterhin wurden die bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen gemessenen Signalintensitäten mit den bekannten Bindungsdissoziationskonstanten der CB4-1-Peptid-Komplexe verglichen und die Korrelation anhand eines phänomenologischen Modells, das sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet, bestimmt. Das Modell gibt die experimentellen Daten gut wieder. Für die höchste eingesetzte Antikörperkonzentration wurde ein

Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0.75$ bestimmt, während bei der niedrigsten Antikörperkonzentrationen die Korrelation erheblich wächst ($r^2 = 0.91$). Allgemein konnte eine größere Korrelation der gemessenen Signalintensitäten mit den Bindungsdissoziationskonstanten der CB4-1-Peptid-Komplexe bei Verwendung von kleineren Antikörperkonzentrationen festgestellt werden. Bei sehr großen Antikörperkonzentrationen wird das Bindungssignal vermutlich durch unspezifische Bindung beeinträchtigt. Folglich sollte für typische Antigen-Antikörper-Bindungsstudien die Antikörperkonzentration im Bereich von ca. 1-100 nM rangieren.

Die Güte des Datenfittings wurde durch Bestimmung des Parameters $[A]_i$ und dessen Vergleich zur tatsächlich eingesetzten Antikörperkonzentration analysiert. Die eingesetzte Antikörperkonzentration konnte nur für mittlere Antikörperkonzentrationen genau wiedergegeben werden. Für sehr kleine und sehr große Antikörperkonzentrationen weichen die Werte für $[A]_i$ deutlich ab, was für kleine Antikörperkonzentrationen eine Überschätzung und für große Antikörperkonzentrationen eine Unterschätzung von K_D zur Folge hat.

Ferner wurde aus den Signalintensitäten der mit Mikroarrays durchgeführten CB4-1-Peptid-Bindungsmessungen die Bindungsdissoziationskonstanten K_D der CB4-1-Peptid-Komplexe bestimmt und mit denen durch SPR-Messungen bestimmten Werten für K_D verglichen. Trotz verschiedener Einschränkungen des Modells, die in Abschnitt 4.1.4 ausführlich diskutiert wurden, können die K_D -Werte der CB4-1-Peptid-Komplexe durch Signalintensitätsmessungen adäquat wiedergegeben werden ($r^2 = 0.70$).

Schließlich wurde ein Modell angewendet und bewertet, das eine qualitative Bestimmung der Bindungsaffinität, d.h. die Klassifizierung eines Peptids als *Binder* oder *Nichtbinder*, ermöglicht. Dazu wurde eine Signalintensitätsgrenze, die die Klassen unterteilt, mit Hilfe verschiedener Kriterien definiert und die Affinitätsgrenze pK_D^G für verschiedene Antikörperkonzentrationen bestimmt. Mithilfe des p-Wert-Kriteriums konnte die Affinitätsklasse überwiegend mit einer Vorhersagegenauigkeit von über 90% vorhergesagt werden. Die Vorhersagegenauigkeit ist größer für kleine Antikörperkonzentrationen. Beachtlich ist, dass innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 66.7 nM und 667 pM die bestimmte Affinitätsgrenze pK_D^G unabhängig von der Antikörperkonzentration ist. Unter Verwendung des SNR-Kriteriums wurde die Affinitätsklasse mit einer mittleren Vorhersagegenauigkeit von 89% vorhergesagt und stellt damit eine vergleichbare Methode dar.

Experimentelle Optimierung und Dateneigenschaften von Serumantikörper-Bindungsstudien

Serumantikörper-Bindungsstudien mit Zufallspeptid-Mikroarrays unterliegen einer großen Variabilität. Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Minimierung und Charakterisierung dieser Variabilität und die Etablierung eines verlässlichen Protokolls zur Analyse von Serumantikörper-Bindungsmessungen auf Mikroarrays. Sämtliche experimentelle Einflussfaktoren wurden hinsichtlich ihres Beitrages zur gemessenen Signalintensität analysiert.

Die Verwendung von Antigenbibliotheken für Antikörperbindungsmessungen bringt ein deutlich größeres Signal-Rausch-Verhältnis (bis zu 30-fach größer) hervor als die

Verwendung einer Zufallsbibliothek und ermöglicht daher sehr sensitive Bindungsmessungen. Antikörperbindungsmessungen auf Zufallspeptidbibliotheken sind einer größeren technologischen Variabilität unterworfen. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Zufallspeptidbibliotheken, abhängig vom Peptidsynthese- und Peptiddruckprozess Unterschiede in der Signalintensität hervorrufen können. Die technologische Variabilität konnte u.a. durch den Austausch von Cystein durch Hydroxyaminosäuren (S, T, Y), aber auch durch die Beschränkung auf nur eine homogene Peptidbibliothek pro Mikroarraytyp, verringert werden. Zufallspeptid-Mikroarrays sind daher ebenso zur Messung von Antikörper-Peptid-Interaktionen geeignet.

Des Weiteren wurde das Signal-Rausch-Verhältnis, sowie der Anteil falschpositiver Signale für Antikörper-Peptid-Bindungsmessungen mit und ohne vorheriger Blockierung des Mikroarrays bestimmt. Die Blockierung freier Bindungsstellen mit BSA hat keinen Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis.

Für die Untersuchung humaner Serumantikörperrepertoires mit Zufallspeptid-Mikroarrays wurde eine Serumverdünnung von 1:10 für IgM- und 1:100 für IgG-Bindungsstudien anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses als optimal ermittelt.

Darüber hinaus wurde das gemessene Fluoreszenzsignal hinsichtlich seiner Zusammensetzung untersucht. Der Beitrag der intrinsischen Aminosäureseitenkettenfluoreszenz zur Gesamtsignalintensität ist vernachlässigbar, jedoch macht die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die Peptide des Mikroarrays ca. 18% der Bindungssignale aus. Daher wurde ein Verfahren entwickelt, um diese falschpositiv erkannten Peptide von denen zu unterscheiden, die von Antikörpern einer biologischen Probe gebunden wurden. Dieses beinhaltet die Inkubation einer Blank-Probe, die Identifikation der falschpositiv gebundenen Peptide anhand eines Verfahrens, das den lokalen Hintergrund jedes einzelnen Peptid-Spots einbezieht, sowie den Ausschluss dieser Peptide von der Datenanalyse.

Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität von Sekundärantikörpern in Mischung untersucht. Anti-Maus-IgG2b und anti-Maus-IgG2c, die für die Analyse der Autoantikörperrepertoires von Fc γ RIIB^{-/-}.B6-Mäusen Verwendung fanden, zeigen kein Kreuzreaktivität. Jedoch konnte für die gleichzeitige Detektion von humanem Serum- IgG und IgM zur Analyse der Antikörperrepertoires von Astrozytompatienten eine Kreuzreaktivität der entsprechenden Sekundärantikörper anti-Human-IgG und anti-Human-IgM nicht ausgeschlossen werden. Folglich wurde auf die gleichzeitige Detektion von IgG und IgM verzichtet.

Die Fluoreszenzdetektion mit einem Mikroarrayscanner wurde dahingehend optimiert, als dass durch die Einstellungen der Laserstärke (5%) und der Signalverstärkung am Detektor (PMT 400) eine maximale Signalstärke gemessen werden kann, ohne dass es zu Signalsättigung kommt. Damit die Prozedur der Signalintensitätsbestimmung mit der Mikroarray-Analysesoftware GenepixPro unabhängig vom Experimentator reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurden die Grundeinstellungen des Koordinatengitters, sowie dessen optimale Anpassung an die einzelnen Spots so variiert, dass reproduzierbare und präzise Werte für die Signalintensität und die Hintergrundsignalintensität erhalten werden konnten.

Des Weiteren wurden die Eigenschaften der gemessenen Signalintensitäten untersucht. Die statistische Verteilung der Signalintensitäten entspricht einer Lognormalverteilung. Durch die beschriebene Optimierung der experimentellen Einflussfaktoren konnte die technologische Varianz der Daten minimiert werden. Etwa 20% der Peptide auf einem Mikroarray werden von Serumantikörpern gebunden ($\text{SNR} > 3$). Die Hintergrundsignalintensität ist unabhängig von der gemessenen Spotsignalintensität. Die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten, die auf verschiedenen Mikroarrays derselben Charge am selben Tag gemessen wurde, ist sehr gut ($r^2 = 0.87 - 0.93$). Genauso sind Signalintensitätsmessungen von verschiedenen Tagen gut reproduzierbar ($r^2 = 0.85$). Dagegen ist die Korrelation der Signalintensitäten die auf verschiedenen Mikroarraychargen gemessen wurden, unzureichend ($r^2 = 0.48$). Folglich sollte bei der Messung von Serumantikörper-Zufallspeptid-Bindungsprofilen auf die Verwendung von Mikroarrays aus verschiedenen Produktionschargen verzichtet werden, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Bestimmung von Antikörper-Polyreaktivität

Auf Zufallspeptid-Mikroarrays wurden Antikörperbindungsstudien mit dreizehn, hinsichtlich ihrer Reaktivität von *Tiller et al.* charakterisierten, monoklonalen Antikörpern durchgeführt und anhand der Bindungssignale die Reaktivität dieser Antikörper bestimmt. Die Verwendung des p-Wert-Kriteriums erlaubte die Unterteilung der Peptide in die Affinitätsklassen *Binder* und *Nichtbinder*. Als Maß für Antikörper-Polyreaktivität wurde die Bandbreite der Peptiderkennung aus dem Anteil der *Binder* bestimmt. Die Reaktivität der Kontrollantikörper konnte so erstmals erfolgreich anhand einer Mikroarray-Bindungsanalyse bestätigt werden.

Des Weiteren wurden die Unterschiede von monoklonalen Antikörpern und Antikörpermischungen in der Peptiderkennung anhand der zuvor zugrunde gelegten Relation zwischen Mikroarray-Bindungssignalen und Antikörper-Polyreaktivität untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Antikörpermischung, hier repräsentiert durch eine Serumprobe, eine weitaus größere Bandbreite von potentiellen Antigenen erkennt, als ein monoklonaler Antikörper. Jedoch nimmt die Polyreaktivität der Serumprobe deutlich ab, d.h. die Spezifität der Erkennung nimmt zu, wenn dieser Serumprobe ein monoklonaler Antikörper zugesetzt wird.

Serologische Diagnostik

Es konnte gezeigt werden, dass Individuen, die über verschiedenen Antikörperrepertoires aufgrund verschiedener Immunitätszustände verfügen, durch ihr Serumantikörper-Bindungsprofil auf Peptid-Mikroarrays unterschieden werden können. Der statistische Analyseweg [22] wurde für zwei Testdatensätze validiert.

Dabei wurden zum einen die Antikörperrepertoires von C57BL/6, BALB/c und H.polygyrus-infizierten BALB/c Mäusen untersucht und durch Merkmalsselektion klassifiziert. Die verschiedenen Gruppen ließen sich mit einer diagnostischen Zuverlässigkeit von 97% – 100% korrekt und signifikant vorhersagen.

BLAST-Analysen der Sequenzen der Peptide, die zur Klassifizierung von gesunden und *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen ermittelt wurden, zeigten, dass diese Peptide nicht auf bekannte Proteine zurückgeführt werden können und daher nicht biologisch relevant sein müssen, um als Biomarker einer Krankheit zu fungieren.

Neben der Diagnose einer Infektionskrankheit, wurde das etablierte Analyseverfahren zur Diagnose einer Autoimmunkrankheit (Systemischem Lupus Erythematoses (SLE)) im Mausmodell angewendet. $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäuse, die durch eine vermehrte Bildung von anti-DNA und anti-nukleären IgG2b und IgG2c-Autoantikörpern charakterisiert sind, dienten als Mausmodell für SLE. Die Antikörperrepertoires von gesunden und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen konnten bereits durch Hauptkomponentenanalyse gut separiert werden.

Peptide, die als diagnostische Marker von SLE dienen könnten, wurden durch Merkmalsselektion identifiziert. Mit jeweils drei Peptiden gelang die Unterscheidung der IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperrepertoires mit hoher diagnostischer Zuverlässigkeit (94%).

Die nahe liegende Vermutung, dass sich die Antikörperrepertoires von gesunden und autoimmunen Mäusen nur aufgrund der genetischen Unterschiede zwischen C57BL/6 und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen, auftrennen lassen, wurde durch ein Experiment widerlegt, in dem die IgG2b- und IgG2c-Antikörperbindungsprofile von $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6-Mäusen analysiert wurden, die noch keine Symptome der Autoimmunkrankheit aufzeigten. Durch Hauptkomponentenanalyse wurde gezeigt, dass sich die Antikörperbindungsprofile aufgrund der Autoimmunkrankheit und nicht wegen der genetischen Unterschiede separieren lassen.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurden die Antikörperbindungsprofile von 32 Astrozytom-Patienten gegenüber Zufallspeptidbibliotheken untersucht. Ein Hauptziel dieser Arbeit, die serologische Diagnose humaner primärer Hirntumore (Astrozytome), wurde erstmals mittels Zufallspeptid-Mikroarrays erreicht. Die hohe technologische Varianz der Mikroarraytechnologie konnte soweit reduziert werden, dass sogar die äußerst geringen Unterschiede der IgM-Antikörperrepertoires von Astrozytom-Patienten mit verschiedenen Tumorgraden diagnostizierbar wurden, was im klinische Alltag sonst nur durch hochinvasive Verfahren, wie einer Gehirnbiopsie gelingt.

Durch Merkmalsselektion und *leave-one-out*-Kreuzvalidierung konnten *nA*- oder *hA*-Patienten mit einer diagnostischen Zuverlässigkeit von 83% unterschieden werden.

Erreichte Ziele:

- Validierung der Mikroarray Technologie als Methode zur Untersuchung von Antigen-Antikörper- und Zufallspeptid-Antikörper- Interaktionen.
- Nachweis sehr guter Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten auch zwischen verschiedenen Tagen.
- Identifizierung beträchtlicher Mängel der Reproduzierbarkeit zwischen Mikroarraychargen.
- Bestimmung des idealen Antikörperkonzentrationsbereiches für Antigen-Antikörper-Bindungsstudien in dem die Signalintensität die Bindungsstärke des Antigen-Antikörper-Komplexes sehr gut wiedergibt.
- Bewertung der Mikroarray-Technologie als Methode zur Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstante von Antigen-Antikörper-Komplexen und Identifizierung limitierender Faktoren.
- Entwicklung einer qualitativen Methode, die es erlaubt, *Binder* und *Nichtbinder* mit großer Genauigkeit vorherzusagen.
- Optimierung des Detektionsverfahrens und Quantifizierung des Beitrags des Sekundäntikörpers zum Gesamtbindungssignal.
- Erarbeitung eines experimentellen Protokolls, das für die Messung von Serumantikörper-Zufallspeptid-Interaktionen optimiert wurde.
- Etablierung eines Verfahrens zur Identifizierung falschpositiv gebundener Peptide.
- Charakterisierung der Eigenschaften der gemessenen Signalintensitäten von Serumantikörper-Zufallspeptid-Interaktionen als Voraussetzung für die Extraktion qualitativ hochwertiger Daten.
- Nachweis der Anwendbarkeit von Zufallspeptid-Mikroarrays zur Bestimmung von Polyreaktivität monoklonaler Antikörper.
- Validierung der Merkmalsselektion als Diagnostikmethode anhand zweier Testdatensätze (Infektionskrankheit und Autoimmunkrankheit).
- Bestimmung von Einflussfaktoren auf die Verlässlichkeit der Diagnose (Datensatzgröße, genetische Unterschiede zwischen Individuen).
- Entwicklung einer minimal-invasiven serologischen Diagnostik von primären humanen Astrozytomen.
- Identifizierung von Biomarkern, die die untersuchten Krankheiten charakterisieren und Bewertung ihrer biologischen Relevanz.

Ausblick

Die Peptid-Mikroarray Technologie befindet sich derzeit noch in der Entwicklung. Dies wird vor allem dadurch deutlich, dass es kein einheitliches experimentelles Protokoll oder Auswertungsverfahren gibt. Um sinnvolle Ergebnisse aus derart komplexen Mikroarraydaten zu gewinnen, sind technisch ausgereifte experimentelle und bioinformatische Methoden erforderlich. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse leisten einen großen Beitrag hin zu diesem Ziel. Es wurden Probleme identifiziert, deren Lösung Inhalt zukünftiger Arbeiten sein sollte. Dazu gehört das Chargenproblem, das einen sehr großen limitierenden Faktor darstellt, vor allem für große Datensätze, wie sie z.B. in klinischen Studien untersucht werden. Hierzu könnten vor allem verschiedene Ansätze zur Normierung untersucht werden, wie dies schon für Genexpressions-Mikroarrays durchgeführt wurde [94].

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit das Detektionssystem eingehend untersucht und bewertet. Als Folge aus den durchgeführten Untersuchungen stellt sich die Frage nach Alternativen, da das hier verwendete Detektionssystem derart große Variabilität verursacht. Peptid-Mikroarrays fassen in der Regel 1000-10000 Peptidspots [138] mit wachsender Tendenz [88, 131]. Die Erkennung gebundener Antikörper mit Sekundärantikörpern ist auf derartigen Hochdichte-Mikroarrays allein durch sterische Hinderung erschwert. Dieses Problem könnte dadurch behoben werden, dass anstelle eines Antikörpers ein kleines Detektormolekül verwendet würde, wie es bereits für die Detektion phosphorylierter Peptide entwickelt wurde [143]. Allerdings gibt es solche Detektionssysteme für Antikörper noch nicht, vermutlich weil noch keine kleinen Moleküle gefunden wurden, die spezifisch einzelne Antikörperisotypen binden. Auch dies muss Inhalt zukünftiger Arbeiten sein.

Eine Methode, die völlig ohne sekundäre Detektion auskommt, ist die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). Bei der SPR-Messung handelt es sich um eine breit anwendbare Methode [32, 117], die auch für Antikörper-Peptid-Bindungsstudien verwendet werden kann [51, 106]. Die Bindung des Analyten an eine auf einem Goldchip immobilisierten Probe wird direkt durch die Massenänderung an der Chipoberfläche detektiert. Durch die notwendige Verwendung von Gold-beschichteten Chips, sind SPR-Messungen im Vergleich zu Mikroarraymessungen deutlich teurer. Außerdem erreicht SPR, mit wenigen Hundert Proben, die gleichzeitig untersucht werden können [130], noch nicht die Kapazität anderer Hochdurchsatzmethoden. Jedoch sollten weiter Anstrengungen unternommen werden, um diese markierungsfreie Methode zu etablieren, denn sie bietet außerdem die Möglichkeit, die Kinetik eines Bindungsereignisses zu untersuchen.

Die Quintessenz dieser Arbeit ist, dass Peptide mit zufälliger Aminosäurezusammensetzung geeignet sind, um die Reaktivität von Antikörpern zu analysieren und um als diagnostische Marker für Krankheiten zu fungieren. Daraus ergeben sich eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten. Antikörper sind wichtige Werkzeuge sowohl in der naturwissenschaftlichen als auch in der klinischen Forschung. Antikörper-Spezifität gilt als Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung therapeutischer Antikörper. Die Mikroarray-Technologie könnte in Zukunft für die Untersuchung von Kreuzreaktivität therapeutischer Antikörper eingesetzt werden. Ebenfalls vorstellbar wäre ihr Einsatz in der Wirkstoffentwicklung, wenn statt Peptiden kleine chemische Moleküle auf dem Mikroarray immobilisiert sind und durch die Inkubation mit einem Targetprotein neue

Rezeptor-Ligand-Interaktionen identifiziert werden [156]. Anstelle von Peptiden sind Zucker potenzielle Probenmoleküle für Mikroarrays [158]. Glycoproteine erfüllen im Organismus zahlreiche Funktionen, u. a. spielen sie bei allen Erkennungsreaktionen durch das Immunsystem eine wichtige Rolle. Daher ist denkbar, dass sie auch als Krankheitsmarker dienen können.

Die Verwendung von Zufallspeptid-Mikroarrays zur Identifizierung von Biomarkern könnte besonders für den Bereich der Krebsforschung, aber auch für eine Vielzahl anderer Krankheiten wie Autoimmunkrankheiten, die nicht durch spezifische Antigene charakterisiert werden können, interessant sein. Sie bieten die Möglichkeit, auch ohne molekularbiologisches Vorwissen über eine Krankheit, diese anhand spezifischer Biomarker zu charakterisieren. Die Entwicklung eines einfachen, preiswerten und verlässlichen diagnostischen Tests, der im klinischen Alltag Verwendung findet, ist das endgültige Ziel einer solchen Studie, wie sie hier vorgestellt wurde. Zwar konnte mit dieser Arbeit ein großer Beitrag hin zu diesem Ziel geleistet werden, jedoch bedarf es noch weiterer Kontrollexperimente wie sie für die Entwicklung eines verlässlichen diagnostischen Tests unerlässlich sind. Dazu zählen u.a. die Reproduktion der hier erzielten Ergebnisse, die Validierung mit unabhängigen Datensätzen und die Validierung mit einer anderen Messmethode. Natürlich können im Rahmen einer Dissertation nicht alle Validierungen, wie sie die Leitlinien für diagnostische Tests vorschreiben [61, 127, 134], durchgeführt werden und müssen daher Inhalt zukünftiger Arbeiten sein.

Anhang A

Tabelle 1: Die Konzentration der Plasmid-DNA der schweren und leichten Kette, die zur Expression von PN46_{rev} transfiziert wurden, wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Antikörperkonzentration im Überstand des Zellmediums sowie die Konzentration des aufgereinigten Antikörpers wurden mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration des aufgereinigten Antikörpers wurde aus dem Mittelwert von vier Wiederholungsmessungen ($CV = 8.1\%$) bestimmt.

	[Plasmid-DNA] ($\mu\text{g/ml}$)		[Ak] ($\mu\text{g/ml}$)	[Ak](mg/ml)
	schwere Kette	leichte Kette	(Überstand)	(aufgereinigt)
PN46 _{rev}	485.13	441.56	35.48	4.40

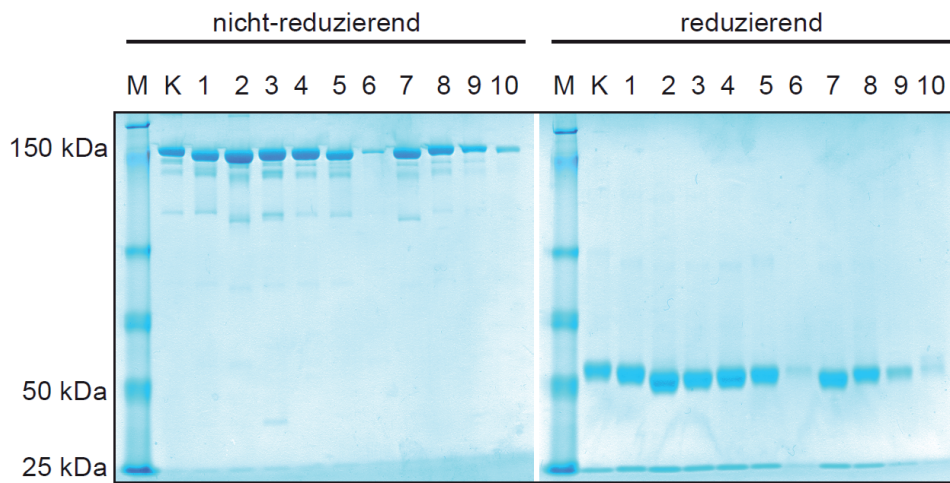


Abbildung 1: SDS-PAGE Gelbilder der aufgereinigten rekombinant hergestellten humanen monoklonalen Antikörper unter nicht-reduzierenden (links) und reduzierenden (rechts) Bedingungen. M: Molekulargewichtsmarker, K: Kontrollantikörper (human IgG κ), 1: PN7_{rev}, 2: PN46_{rev}, 3: PN56_{rev}, 4: PN60_{rev}, 5: PN67_{rev}, 6: PN7, 7: PN46, 8: PN56, 9: PN60, 10: PN67.

Tabelle 2: Sekundärantikörper wurden mit dem *monoclonal antibody labelling kit* von Invitrogen mit den Fluoreszenzfarbstoffen A647 und A546 (Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 546) markiert. Die Bestimmung der Antikörperkonzentration sowie des Markierungsgrades erfolgte photometrisch bei 280 nm und 558 nm (Alexa Fluor 546) bzw. 650 nm (Alexa Fluor 647).

Sekundärantikörper (Bethyl Lab.)	Farbstoff (Invitrogen)	c [μM]	Markierungsgrad [$\text{mol}(\text{AF})/\text{mol}(\text{Ak})$]
anti-Maus-IgG2b	A647	41	1.10
anti-Maus-IgG2c	A546	34	2.47
anti-Human-IgG1	A647	38	1.26

Tabelle 3: Die Probennummer, die Diagnose, der Kortisonstatus sowie die Serum-IgM-Konzentrationen aller untersuchten Patienten. Die Serum-IgM-Konzentrationen, die durch ELISA bestimmt wurden, sind Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen ($CV = 15.9\%$).

Serum Nr.	Diagnose	Kortison	[IgM] (mg/ml)
106	A-I	ja	0.74
40	A-II	ja	1.76
75	A-II	ja	0.96
82	A-II	nein	0.84
95	A-II	nein	0.47
144	A-II	nein	1.15
149	A-II	nein	0.62
178	A-II	nein	1.08
4	A-III	nein	0.84
28	A-III	ja	1.18
164	A-III	nein	0.72
2	A-IV	ja	1.44
5	A-IV	ja	0.28
13	A-IV	nein	0.60
17	A-IV	ja	0.74
31	A-IV	ja	0.39
41	A-IV	ja	0.43
45	A-IV	ja	0.73
47	A-IV	ja	0.34
51	A-IV	ja	0.38
57	A-IV	nein	1.07
74	A-IV	ja	0.52
103	A-IV	ja	0.22
108	A-IV	ja	0.66
110	A-IV	ja	0.36
121	A-IV	nein	0.31
128	A-IV	ja	0.38
145	A-IV	ja	0.77
176	A-IV	ja	0.54
186	A-IV	nein	0.62
188	A-IV	ja	0.42
193	A-IV	ja	1.54

Tabelle 4: Die Signalintensitäten der IgM-Bindungssignale von 49 Serumproben der Astrozytom-Studie gegenüber Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$ wurden logarithmiert und durch Gauss Fitting auf Normalverteilung hin überprüft. Die Probennummer, die Diagnose und der Regressionskoeffizient (r^2) des Gauss Fittings aller untersuchten Patientendaten sind gezeigt.

Serum Nr.	Diagnose	r^2 (Gauss Fit)
106	A-I	0.97
40	A-II	0.98
75	A-II	0.97
82	A-II	0.97
95	A-II	0.94
144	A-II	0.97
149	A-II	0.95
178	A-II	0.92
4	A-III	0.95
28	A-III	0.96
164	A-III	0.94
2	A-IV	0.96
5	A-IV	0.87
13	A-IV	0.97
17	A-IV	0.93
31	A-IV	0.95
41	A-IV	0.94
45	A-IV	0.92
47	A-IV	0.92
51	A-IV	0.93
57	A-IV	0.95
74	A-IV	0.96
103	A-IV	0.93
108	A-IV	0.94
110	A-IV	0.94
186	A-IV	0.97
188	A-IV	0.93
193	A-IV	0.98

Tabelle 5: Die Sequenzen der durch Merkmalsselektion identifizierten Peptide wurden gegen eine Proteinsequenzdatenbank verglichen (BLAST). Die maximale Trefferzahl, die Sequenzidentität sowie die Signifikanz der Treffer (E-Wert) wurden bestimmt. Bei den fett markierten Sequenzen handelt es sich um EAE Antigen-Peptide, die durch die BLAST Analyse auch als solche identifiziert wurden.

diagnostische Fragestellung	Peptidsequenz	max. Treffer	Sequenz-identität	E-Wert
H.polygyrus	SGFPDKIEFPTQDC	24.0	71%	8.80
	VSLASSSARGDTYF	24.0	100%	8.80
	QKDTSRKNNKEQGL	28.2	57%	0.46
	KEEKSEEEHEGFRD	28.2	71%	0.46
	TRRYNIMSKIFNTW	27.4	64%	0.83
	THEDFRYDDVFEGN	24.4	85%	6.50
	FFDEIIHSCRSQNG	29.5	85%	0.19
	VRQVQRSKMHKKG	23.5	50%	12.00
	QQAQKICKETTIELD	28.2	64%	0.46
	ILDSIGRFFSGDRGAPKRG	64.3	100%	6.00e-12
	TRTTHYGSLPQKSQLHGRTQD	66.8	100%	1.00e-12
SLE	KDQDAEQAPEYRGRTELLKE	67.2	100%	8.00e-13
	STDDYEDAASQGTE	23.5	85%	12.00
	FKTRVQDGSPWKTA	22.7	50%	21.00
	SITSFQDMRAPTSQ	24.4	78%	6.50
	KTNYTNTAKNVKSI	22.3	57%	28.00
	RSPQDMLTGFWLAH	24.0	57%	8.80

Anhang B

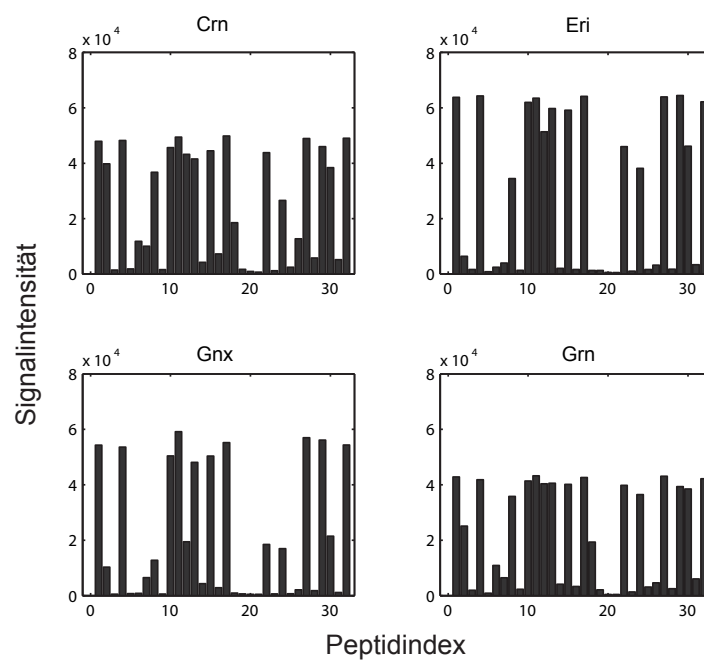


Abbildung 2: Signalintensitätshistogramme der CB4-1-Bindungssignale auf vier Glasträgertypen (*Gnx*, *Eri*, *Grn*, *Crn*). Bei den Signalintensitäten der 32 Peptidspots handelt es sich um die Mittelwerte aus jeweils vier repetitiven Inkubationen.

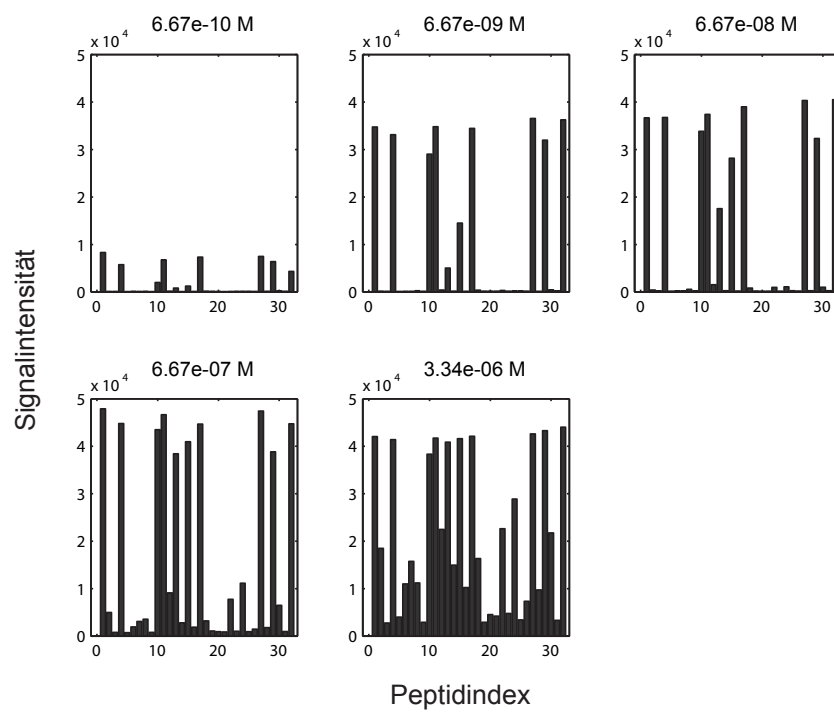


Abbildung 3: Signalintensitätshistogramme der CB4-1-Bindungssignale bei fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen ($3.34 \mu\text{M}$ bis 667 pM).

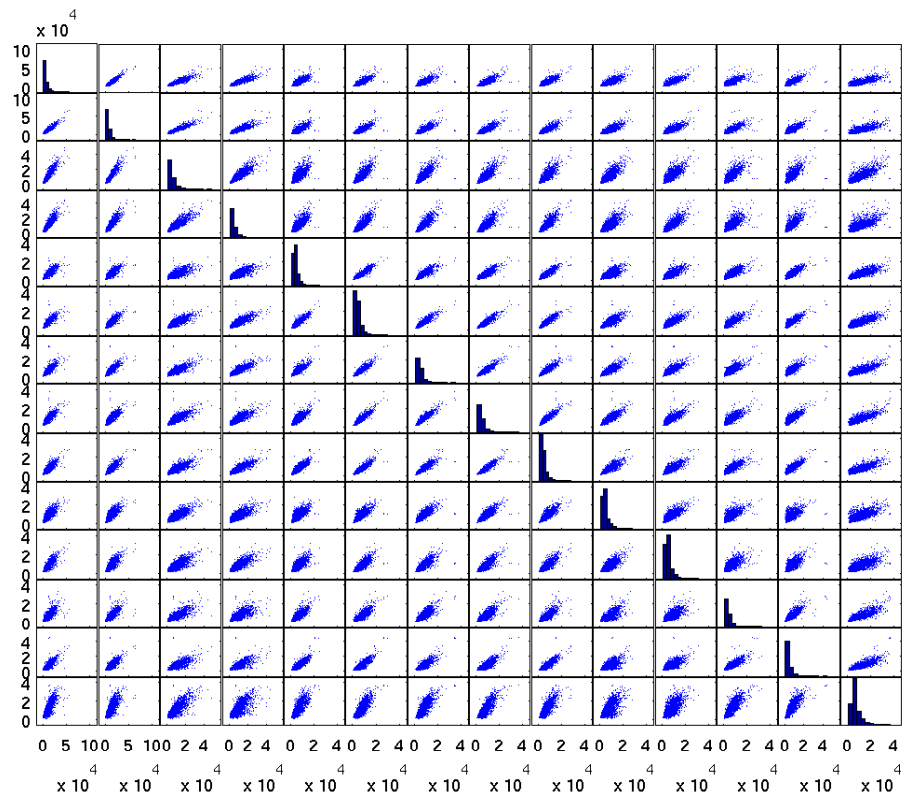


Abbildung 4: Plotmatrix der IgM-Bindungssignale von 14 repetitiven Inkubationen des humanen Kontrollserums K13 gegenüber Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$.

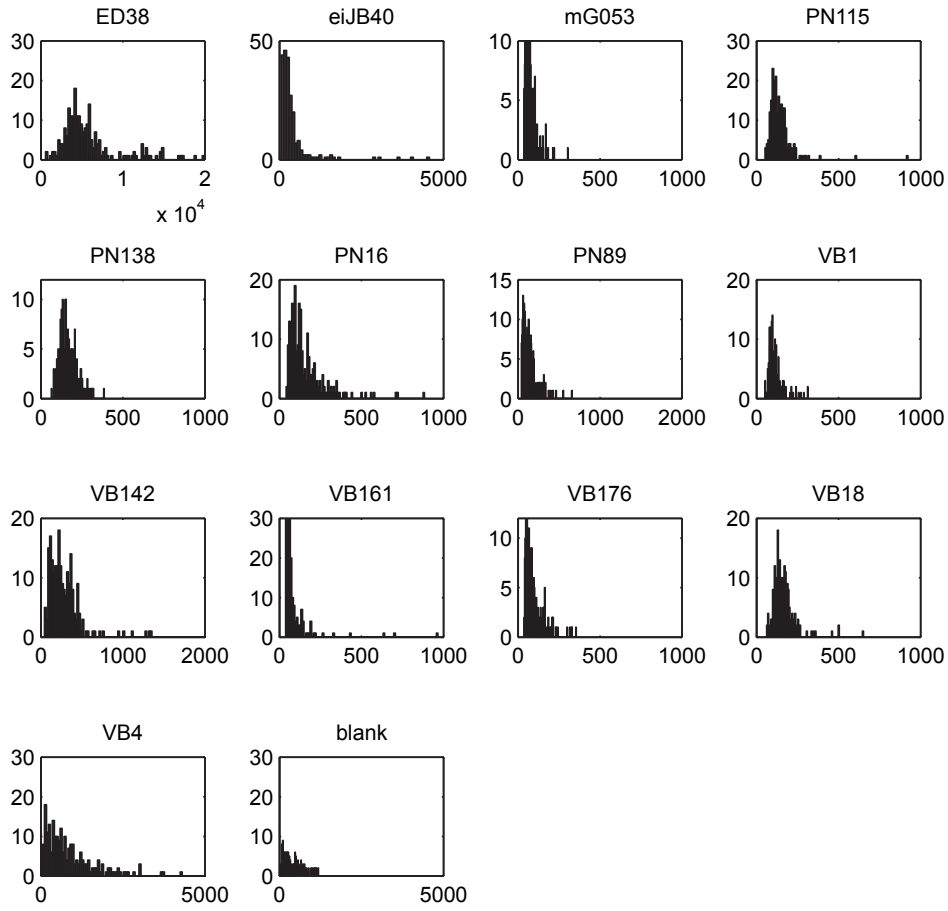


Abbildung 5: Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale zehn humaner monoklonaler Antikörper, dreier Kontrollantikörper (ED38, eiJB40, mGO53) und einer Blank-Inkubation gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

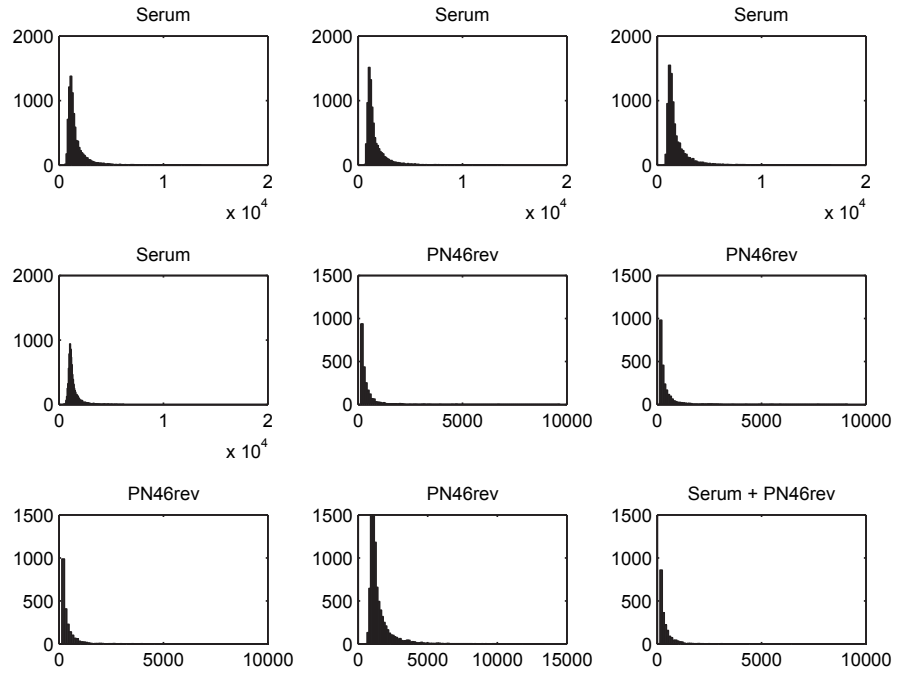


Abbildung 6: Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von vier repetitiven Inkubationen eines humanen Serumgemisches, des monoklonalen Antikörpers PN46rev sowie eines Gemisches aus Serum und PN46rev gegenüber Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$.

Tabelle 6: Die Sequenzen der 273 Peptide, die vom monoklonalen Antikörper PN46_{rev} gebunden wurden.

AYWANLTWGPLPI	RSPIKFPYSGFNTMA	DAMFPPNYSTMPYGL	TITGFPPYAAEVPDY
VTKNDSTQVFYWL	IADVWMSDWNKNWNS	NMSLSFWSMVVVTEN	QHISMKYLTKKAMWF
GPHHPPPISSWADTP	LMMVYMLTEHGERTY	FFYTQDDYATIDYYV	VGDTDYHKKTENAMR
RWKRRQYMTDGP RHT	QGIPPWYKLPEQLYS	HAEFMHFTWVALDFH	EWQYLTMGWPDYD
YWWPSFMFRTEMYP	NIEHIEKTYHWTVPA	SAMVQHSSINFLQVE	HVMEWFQWFQHLKQ
GWYVWNIHYFNEND	IVSYIQNNKNISWEV	EAHTFYVVHQENPRE	TLGLIKFYNTDKWWH
PGYSGSWYTTDVGHW	PKASILTWEYGR	NYVGWHSFSDTWW	FWYRGYRSHWMKLQW
FWEGDIHTWMATFYN	WFDPASNFPGGIMFP	WYDYYATGGMETQNF	YRVPNMLIVNLSTRA
PNNMDESPDYFYTAW	EAQFAVWSWRGQEFV	NKQAVEEADAHHTW	INWPGLITNWSQPFP
MGVWVKYYETWETFY	YAPRAKGYGAYIEHT	TGQARWNFKFETWFS	VKAWPHTIPGNWV
MWGKTISLVAMPTWI	WHPLYRTWEDRYA	QDTQVQSFFFVITWW	EPNIPVVIFETLMQK
KDQYWNFTGFPMLTA	HIERPPWLHVYQANW	WVFLHFLGYSTYSGD	RHFEIMNAKELLLYI
HRFEPITYIMWDLN	STFWPIQFWFDNDFM	WNYAVFESVHPHKLA	WLDALYVWAPHQTQA
VWDNLERFWIENAVE	IILEFWAYMYDHMDT	KIFIMPVYWDPSYME	QLSDEYWYAHAGMGL
WFSEQQATVWVHDEF	TYFYATAHEMGFDVR	NQPDWYVTRDHSFNA	VMWYDSNYSNGGWTH
FWPQMAATATFTWDT	VMTWLMHDSQRYHAR	WLTHAATYGGFFVER	HNWVKTAHGYRNLEA
ATAYIEAMSLQYNTT	GMSPKVLYTHWFETD	KHYWPAIKSPWWEKS	EPEMYEGTAFKPLYP
VQTRRRFLDHLKAD	NNYYPGTGDFYIY	IFMYAVFTYKPSPKY	WSWFFHTRWMGKPVQ
SIERDKSLRRHIGHK	GGGTWVWYYEMLQAK	FLWFDHSPDILDPI	IWIEANAELHWFQWN
PLLSTMPGERYITYA	VWPWEFLYQHESTHE	DYWDWLYTVWDYSVK	NNWFQLDYWAWYFGT
RMDKHVEYKQYWMWS	YAVHPPQTWDWPYLYK	HWLDFVTQYGEDA	YSATFTWYQDEEWYV
GRYERPEGEFPGPQT	HQIPKVTHEVDFGYE	HYPTTITGAWHRDWV	AQFHDSHMPVAAVKP
DFASDLVNVLHGWL	IWTHLMRSQDKIWE	NIEHARITDMYGFVN	EKSWTTDSSKISRSA
DILDQKFHIDVTQSR	WLTGITSMTMFTFIR	WSNVWDEDWMFPLYF	GNNPPKATKSMTMLQ
WHETWWSIVLNYMH	ISWINAMNVASYYS	MSFEHFGYALGTPAQ	DWGHHTMANNFSYFF
EHNLNPVWIVHLAIF	WFNEQTASISKFRGW	QATSTLKYFADYSKY	MAFNFWATYPAFMTT
ADNIIQMYTKFGAGW	KQFYGTWSGYWEFGG	YYDEYKLYRSGAPQN	IWQMSWNYGYFRNPP
VNETYNSPVDGWFFA	MGNGLKGLVNWAPNF	LSHRAGSDNHVQQIE	DHDHNFHSINQDFDY
SNSMPRQGHHTGKSP	PYHIYVMEWYNEDIL	SRLKQWKSHWDYPEW	SWHMTFGYTVHNADN
GWYNYFHNMMNPKYD	PENQAFSSFEQHGMW	AEERHPTVTIIVRD	QKWGFQGSRWKRAT
QHRNLTLRRQDGE	DEKINNTEWSGRVY	SRKTLNTIHEIDGLE	NKLRLEELQWPNDYF
NLIWWRPNNGNYPHLL	WRWILDSYEHMMGV	NARPPLHKWMIPEGW	RWDKYDRPQSWNFY
IKKISKARHELNGNP	FFERINTYFQGYQDE	EDEYIPDSYGWEYVW	VKMWIMQYNSFVVDY
EWMWYEMKIIMVTKV	EGDEWDIKSGFYGRP	TEMWVWAMQYMVIGR	IRIHWALAFQMVGVN
YLELHAMNYDLMING	KVTYHHGSMFHPFVW	PIYVKTHSSKHKGRF	WMHPENQSFKKPVWN
SPLVYFLHSWWTKNS	RWMTLWTYDFVEKHY	RSFVHLFSTNYQGNE	HLKGYHTFWYWRT
VKWDYEPSGEEIFWY	FDFLYSGNGKEIWQD	EMVIKKKYHTHWYMG	RDFVGRAVSGIWLKA
LHLFMVNSNTWWYRD	ITATDKFFHDAFEFY	KVNPVWFSPYQTIPN	HMARGRGSPPYRVHD
QKSEWSFFGAQTFPY	PYQTLTLNMEYVLYT	KNPKAFFYIYVYITL	FNKQAWQSETVQFLP

VMSKTWNRKYEFDGR	TVPSIPYQVEQLNKH	TLPKIKTGEFTDQYM	RFYDRSQIMDLWWI
GVKGQMPPTIMIFNM	TLFLDLMAQAMRYAQ	MVKTGWDSQREFVYY	HAKYFGTMTPAQYSW
NRYALKRHKFQRWYF	QWMLEHYTRREPFWF	AWFERPTVYFGHT	KYMEWQLYDTINKTH
VKLDLPVDDDVNPI	QRTYTRGRFDYFYGAR	EQPSGYKGEYRNAPW	VSAYVMWHFDDVVWS
QWFGADYSTAFDRYI	DRWHDYNNDGWMFAK	AAHNFDVNMWWPAPP	DSKYHTIVRVFPLPG
EPGAWQTYFQLWP	PGIPAILNGRDQRNE	QSSFSGWYQSDLWGP	ENSFSYPYRKRFLFF
ESKRVIQDQEHLMQY	WLYGWTQMSGDY	YHTEHFNTFYEHLMW	KRMFNWTWPGAYI
YMGSTNEWVLSTMHW	RRMISRMPIFYLMSG	EQFSWRTMYVHEL	IPDSPYKKSQAGNQP
TEQFDSWHWYTNVWW	ANAVVDWSWQWYHIH	DRPVSWGSWPVIMIF	PEAETAKLELDDIKV
YWPYPKAPAPYPYAS	ATAEFMMATATILDQ	WPNGFHQFNMLTEQ	PRYESVTQWLMYWQG
YMDDEYEGTWYRNVY	IKMQTVMGNFEGEPT	TNEYIGTYHNWGF	KYVQKMDKWQPQATV
MAILNLERDHDNRV	QGWPAMYTMVFFR	MFWWPESNTWRGTI	SLNETGHYGVDLWSP
SAFQWRGLKLANQNI	FMPHWHIYAWQSAEE	FYAVWTYYPVTHEFI	LAYAPFRSFWAWWGV
EENGVAVGYRIDSF	WEMHIYYSWPMTPIT	MFPDLELTSEAFPWW	FIGYHTTVWDWMW
HKGPGADAKQNVFVI	FAAARMKKKDHNPYE	DQFYFAWAFEARGGF	VGIRQVGPETTYRYW
WRYPGFESYIAFTHY	MHLGTKNDRSWNHEK	EIHGPPSYGYFPFSL	GWRHEANMPIRKEHP
TVDVGGDFWEPNWFY	EWFILKTDWLNMA	DEAYAYRYTNTPKWF	KRMFNWSWPGAYI
MLYHDLWIMWPNREE	TSIDAWVTSGDYWGY	TIVHWTWSWDKNWWI	QAVSWFFYNAWEMAH
ALWQHSTWNLEMFA	QHWDVLFPTMPGPYQ	DRPVSWGSWPVIMIF	FIGYHTSVWDWMW
FEDASIQDVMAQLYY	NMHDKGWGTQEWGL	YYHLSQYYDNVSIIDY	VITNYVSSRGAWYMN
RVAFAQWDYQRVQWHY	FHWLQYNYADSQTYS	TNKLDKYIHRFHMHE	SKYYMWTDWFSTT
DEIYTAIYGFVWDFK	DRPNTIPTYWPTYGT	AQTNRDSWVPVRQMR	WLMRFGSDYIDWH
ISIARGFVDYDGQVT	PWIWWEATHNPRWTA	SQMNVRDKTKKQQT	IPWFVQTKWNALP
MANGLPWNPNPKMPR	VYGDSAKYIEVNYLW	PMYAAAFIWWGVNNT	WDSMLMSYNFHLA
SMYPMPWTGTMQAD	DLSAKTQDFNEVYPR	KKHFFPAKVWHNVWQ	EQPDRAETQEEDAPP
YPYNYMDSGANIPQE	WRENVPETAVPNTGW	WFDDKASFYWIYY	SKYYMWSDFWSTT
VAVFPMLKKDKAQTS	QYYWPGFTWRAPGEM	TVQWEAYAQHINGWL	YFEAARIWIADRGY
FGQQTRELNPMKAD	YFTTWNNTPATPYHF	WISYEFIYNLHGDAR	RHDQKAWSKYRRQFF
HREMAEWILEMITKP	DYFHVYDTQENGMMY	TTAMETIVEAGDAPG	SDHVAEMSGWYFYRE

Tabelle 7: Die Sequenzen der 410 Peptide, die von Antikörpern der mAk-Serum-Mischung gebunden wurden.

NTSPIYNFWKGDYQY	WHQGVDHPIMTHTMH	ERQEGKMKWNYLAEP	YQAHYRPKATQQKNI
DVIQGLEASATYANY	WRKTKGIIWDIGDLA	DNVYPPLPMEKHANW	SYLHAGKSPLDSMGW
KEDLTMLYDPAISAW	IKKISKARHELNGNP	VSFQTDWFVTTWEPM	PAGDDTGPFQQWQKP
LVYWPWRLDKYMIR	TNSMAWNSEWPMFTP	IIMFFFPVYQQQNNQ	QVETEIKDDLGRTKQ
MQHTFEWMEVFAQSL	WPYGVWTPEQTRQHE	DPHNHRLIWERQEEF	PMPYESWTVDAQRWD
KVDSKTGTPHFEDRW	RRLQQFMQDVYYFPW	TKVPEHRMTQHFKVM	ASPIIDKQKSVREFM
STAQFWYEDHTAFLT	YVGFFSETVQNVAEM	EENGVVAVGYRIDSF	IYEQQHVHIIHMISG
ELPYSKYLRLIGAQF	YLELHAMNYDLMING	WNVEVPWTDGDFYA	AEWQMFHTSMPDFHD
PSNWTRKGIEKYSFT	FQKMSLVTEGPMGA	RTIYKPANSMMMPVT	PSTLTWEHDDHSLT
YYFFNWKAWLNRTYR	GEFNLHTGGERWF	IWLLAWEPKVRGNWG	IWGAGWSEYSGHKLT
EPGFHYFVLHQPKVH	MNWHPNITISHENIF	NKVDNFDPPVDDKM	KHLVDLRSMKIIRSY
NHAWGTFSWHEHSQE	GFSEAMFTAMRNQG	QMTVTTMWQREDAMW	HYFDEAMARKNEMQF
LQSWGIIQDRLSKLVN	AMWQANIPTMQDAWN	VLHNNLTLLKIKSKAH	ANIPISEYHYGWSAL
FHMWTHAMTDLSQEL	HYQPQPDWSQSMNTM	RMMNLPQQFAWDFAP	TMYEMYTPAPFQT
HVDSMHLTKSVWNGD	DIEKYYETSNTHEII	FEDASIQDVMAQLYY	RSTKDLYETLHNQSF
GQAHVMMHWILEREWG	AKHDVSYDLAMLPHA	FQQFWFDWPRKMPET	MGPKMAESQSYWGTM
GMPKPEVTHGLNQFF	TTTDMGFTNYDQMWY	PPNYSFTPKWSDWAM	QPWLPLMSHEAPHGM
QMGMFYRSMWDVPND	QKSEWSFFGAQTFPY	MRIQILSRAHTKNKW	SYQMDNMGAYIKYQT
WAHQRVGTGGHAVFI	YFLIWHITTALDMDT	GGDWYAEKGIMQFED	EGNPFMRKTINRGR
AGYMEGGMVGLWHTQ	AEMWTQKWEMGAYTA	TTAEVTPFEDENPHI	WLWPPTGTHMSAFQN
YPGNRWGERHMDLHE	THYATNVYTPVKFGY	SMYPMPWTGTKMQAD	VSRYPRYVPHVSVWD
YWWPSFMFRTEMMYP	MMVTYWEYYDGHDF	RGPWKPSDQDQND	WVANLNYNDGKAPH
AWNIPDPHVGRHWQD	AAQKSYRKYPHPAD	VAVFPMLKKDKAQT	AKMFRPHDFSMGVEQ
TVVGNRAKIQELYEM	WKEQDLPEYMIHFL	QVLTKIEESYVWEVL	RTERPPEYFASEWGG
PLENGHPVTPSMWSD	EYAAKSGSYEFWSLY	FGQQTLLRELNPMKAD	RGTYHQWNLQHDQE
PGYSGSWYTTDVGHW	TWASHRQTLVAVNEV	HREMAEWILEMITKP	GVLHETSPDFQTNMV
YPYLRMDQLMEDPNK	GVKGQMPPTIMIFNM	ERKVWSAMQFAHDI	ANRNKSARARNWSN
DLMDVKMDKPGWSDH	VKLDELVDVDDVNPI	IADVMSDWNKNWNS	VFANKWHTVRKFHNN
PNMNDSPDFYTYAW	EYMDWTTHMHHHAT	GSLSMFWAWANNPEL	FEMDAALMQSFNLLK
MAEWPTETIKSSTVN	WIVNESTRWFFDE	KDVWSYARVYSKVKS	WITSGYVTYEEGEFW
FPWYTTMDKVTDNQ	NLLIHHVRDWLGRM	WFDPASNFPGGIMFP	IAMLHAKTVRQRLYE
KGKKLHTGLPLDTMY	TQDFYLPYREFPWE	QYRGEQNAVENFSRR	AGSWRRYQKANDLKD
IIQYTVYQLQDAPVWA	PTVPDNHWATWERRS	HPNGHTESWEFMGQM	RTKWFKLMFTIGEP
HSNWRWLWTFRQDQT	VYMVETYDGIMHPMY	SSVSDFWIAMHHNTM	ATAEFMMATATILDQ
YLRQGAYWPKGNEDG	MALVQFGTYVRQQVG	EWRAFNMSSSHYL	AYFFITVMNLGPGLD
MWGKTISLVAMPTWI	AHTDTWYKMYVQTD	STFWPIQFWDNDFM	GSLPMLWYADGHEQ
YGSWRLWIMNYLMNM	RHGPYDAVYATYHQ	WLTGITSMTMFTFIR	EFAPLFILETYRLDT
VVDNLERFWIENAVE	MIHLETQPYFNFKND	FKRWWQGHWKEKPTA	FMPHWHIYAWQSAEE
LLPHNTMYLEMNWGS	RNHGYMKNMFLFMMY	PMTFGGNSYTLSTQA	FTQFLDSHMWKFPYG

IFMLHGAQNRHDEKG	QNEPHTFQFRHWSFF	GITGQQHSHNGTPDW	SAYHVQDQGSQEMWL
SHGNIYEGKYTINKN	DGESHETEFYTM	TLPKEPYLQDQRIWQ	FGDILDSWDEVIEW
SIERDKSLRRHIGHK	LTIAAGHHYPKRLNDN	PYHIYVMEWYNEDIL	NSMEVTDTWYAFPWS
HIAWIAKVLNKDRTF	AFLHALRPWSDRAMF	PENQAFSSFEQHGMM	LRHQKLKSDPVDNHW
FTKTPDITNNQLWSW	WYWTYQPGNNGANM	EGDEWDIKSGFYGRP	VFMTLWTSSWEADEI
EMMKYKTQRTMERWQ	YMGSTNEWVLSTMHW	REVSKQATWNDWHHM	QHWDVLFPTMPGPYQ
KMRAEDLFKEAYFMP	GWMIFPPKVWIDAVT	KFKTKREHRVPTALM	VKIRRKQPDKAIYLI
INVWIETGMYFEP	IAGQTSSTPFMDPPW	TLFLDLMAQAMRYAQ	PLFDSVILEWPINDI
GRYERPEGEFPGPQT	KKWEMTQGLIPYTHD	QWMLEHYTRREPFWF	IVFSLQWQLAERRFN
AKHSWPEMKWDQGYH	GRIFQQMGENVRALM	TLNSYHTIGKDTMEF	KTHAISDFNSDSVSG
ADDMDAYSIGRNDW	GALVGGISWGQGQIT	KTEQWTTPVAWD	TDPNAFTAGMRRHR
KLQAQWEYMQRTWRD	DDYEAHEDWHIIAMY	TGDTEKAYQIAQWVE	ADDMHQNDGADKMRS
DILDQKFHIDVTQSR	KEDLTMLYDPAISAW	DQVHPVDPYDLPPAG	PWIWEATHNPRWTA
WHETWVWSIVLNYMH	HWTKWMVGPNLIHVP	WEHIGEEPPQKPDWL	EWPHAGRWMMDMYGEP
DKLGNPTPYNLWM	HEVTEVWDMNFSAK	HFANAPAESAFWRLN	TLNIYKLSVSEDLMH
IFWKPVMSLGQTWEM	NITREPWYWPAAWLQ	YQVQAHSYLSVVEPI	WHLEHKNWVDVYWDY
SNSMPRQGHHTGKSP	YDAQMIPMNNRFVSV	VFPMMWWSMMWAKEG	DRPIWWFQAMPYTGL
GWYNYFHNNMNPKYD	TEQFDSWHWYTNVWW	SQDQKRDHKEIPIY	WTDDVKNTPIKRRTTK
WFQMMWESENEQNRM	YWPYPKAPAPYPYAS	DRWISDVSSINPFIQ	RGKRVQNSGHKNTIP
SAMVQHSSINFLQVE	TRHNDGVTDGNEYGH	MNNIGWAYEVVSTND	MVYPGQDNTNHPKLT
WYDYYATGGMETQNF	RPHMQGTTWMWNE	QKWHVKFVYELDENQ	VPWTNVLSMMWLWKQ
VPIVVKGGGDHMHFD	IKQFNPFMWRKFLKS	AIDKNIWGNTMFWWI	DVEVFDEVNQEKDF
PEIFTSHIQEQRWRS	WPNNGFHQFNMLTEQ	RHDNTLDWINLHMQT	LIWGHTWTVSGKFGH
IFMYAVFTYKPSPKY	GPTWQRIKIYIPVKY	RNKPIHHQDEYVVIE	EGYYKDVMLDDGNFT
EQIMLPHPIDHAEDH	VNDSFNLLVIDMGMR	QMPEISQEKGMGMYG	STGQSVSITKIHMQH
MKQLHHGLGDNAENY	YKIFDSPVDGAWPIQ	DNVLDQRRTDDENIA	YTHEFKIAEGAVYDM
YDVTEKTWNEQMGAE	WAYDEERSEYDMTDR	HGFEISVWEDVKQKL	MFDSNGTSHPSLAMK
HYPTTITGAWHRDWV	RYFSDDFTDSWSSYD	TQRMKHLPLDMKYYSQ	EVDHYVLAENHVWME
DFMHPMMHPQRNFQD	YMSLIVLIQQGNWAH	YNQASHFRPIQWGAW	FFANDNPRHQAWIPV
FTFGHPWYDTSVMDH	FYAVWTYYPVTHEFI	ANHSHNADWEYNEGF	VINDTKRYMVDKDSF
NARPLHKWMIPEGW	MFPDLELTSEAFPWW	GDAPMGMEEVGFQFQ	RHTFMHQYGAWESHP
RSFVHLFSTNYQGNE	ENMLVFGDAFPIYPQ	QPSSVIKYNSTPARN	TQLINVTNAILAY
EMVIKKKYHTHWYMG	QRSVKWKNKHIDVYN	TKRVENHVWMPKFP	DQNMTHQTSHMLEQW
KEARHEFVYMHYVAG	LSDANLNKKSQYDHR	QDNDYGFHFGGVGRQ	YPWIYHMPMRKDQQ
TLPKIKTGEFTDQYM	VGSMSGGYGWLEGEQ	RHPTVTEERPPVWDI	VFPMASQGFWE LRNK
EQPSGYKGEYRNAPW	EIHGPPSYGYFPFSL	NPHRINMWYAIPFVN	RMLPRWKGEGYMDSH
AAHNFDVNMWWPAPP	TYGVFKLMPIGYIWL	QADARMVAEDYINWY	TNKL DYKIHRFHMHE
DRPVSWGSPVIMIF	QFSEMIDIEGWRNQG	EEDAQSAYPWQTWGW	LKNDVEWIVHWGTNP
SQWGDEEIVLVREWM	QTKHWELWNVHIEGA	SDEKIRKIMENTDWF	ALNTVDNWFPGPTWWE
AQTNRDSWVPVRQMR	EVDLWTDRLTWMMTI	IPDSPYYKSQAGNQP	GLTAPVLTVYNYFMG
RMYHGNINNFIAILV	FEKSKGREHIEGRHD	PRYESVTQWLMYWQG	WVVPFRGAWGDL LFG
ALQHRMTKPAQKYGD	QQFFMESEWFPIW	KYVQKMDKWQPQATV	EFSQMESYPEDYFPI

QKPVAMYTTYKNTKT	VKAWPHTIPGNWV	SLNETGHYGVDLWSP	WSRNMNQSAWEPKWW
QGHDATAHDSRPTHSG	EPNIPVVIFETLMQK	FIGYHTTVWDWMW	IPWFVQTKWNALP
TATATNWQIMWRQRP	WLDALYWVAPHQTQA	HSMQWGGAWTSEHRE	WDSMLMSYNFHLA
VKMLFILKFMTNKDW	MVYMEYTVDVMWV	PDSKMNSTDEMYQTL	TDAMSDTPHPPLPMW
WLIPLPRNALGILRN	QLSDEYWYAHAGMGL	YGEKVETNMPWGD	NSWIVASSYWDSSKV
TQQGANTMGFWQM	RNLDSPTPYGIMW	DETFSTIRSAGYDDQ	LYPSSNDYLDPLTIM
YNLGESTRMHMD	HFLHMMWSASNANSE	NYEYAHETGEIAHIQ	WNHWGADTDIEDTRE
HKWTNRIGFDHKDYM	VDDMKYGTSTDYMLA	LNWFEPTHEPDYF	IRMPVHMIQEDWIPN
QNNRLRTPHNSHEQL	YREQEDASYWNWDWP	EWMMHDYSQHMNWAY	EKFWSERNEIMPDAG
EWHTMEMSNWDWMQ	SHYDYVGPQFGAKWE	QAVSWFFYNWEMAH	YGDELKEKAPLQAPT
NRSMPHTYMDEPY	RKNLEMHYAVDMTHE	NWQVKDTIDTNAM	WQQDEDWTVMPPERY
TQQGANSMSGFWQM	HWAQHGKWMQAHIAIY	NTAMMETIWKSWF	DIHYGHHKEGSIMRD
FWNYHHNWQGLAFNA	FWVFLMSMEMHYAPD	FIGYHTSVWDWMW	PDHPNYLHEIQLPPM
PQSKNRVQYVLNFFY	WMHPENQSFKKPVWN	KSSEHLGNTSSAIKG	YFEAARIWIADRGY
IGNADWEPWWEEMVW	AYVLMIEHQVWNLAM	PLFYERPNIWVNTTY	SDHVAEMSGWYFYRE
KPVDIHTVPTPFM	VEMKNEWWMHGDVYT	VITNYVSSRGAWYMN	FKGAFTHFAVWE
DSNMWWSEMSLGG	LKKDMLAVWPSNYPG	WLMRFGSDYIDWH	SKYYMWTDWFSTT
YLNNDTTVLAEW	NEIDGITTSHVDYST	ATKREIYFDDWPNVD	ALENQELADWLTVHL
GNRVFMGMQFQGAGAN	VSAVYMMWHFDDVWVS	LFTNKHTFTPTQMAE	AGNMLWTHYLNGDWF
QHISMKYLTKKAMWF	DSKYHTIVRVFPLPG	MPMPEFTHQGMDY	WRKDYVTWETEQQVN
NKRQPMRHPPTYAI	YMDDEYEGTWYRNVY	KSYWDHLMGDAGQIS	WLTAEVTGEQWLY
LYFDMPGYWHTMQMS	HAEFMHFTWVALDFH		

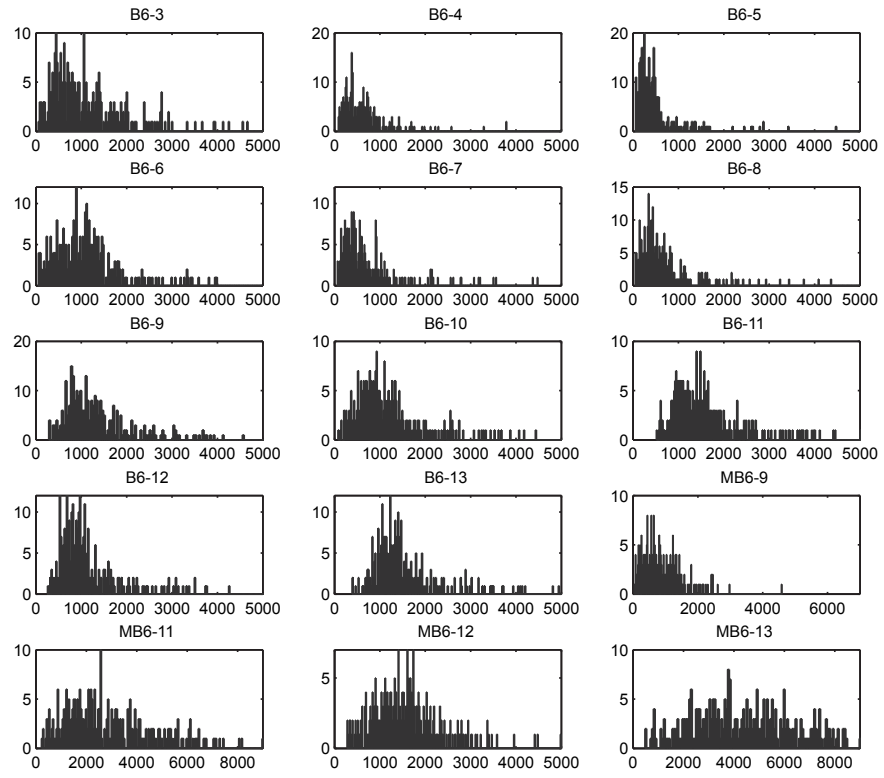


Abbildung 7: Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von gesunden C57BL/6 Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

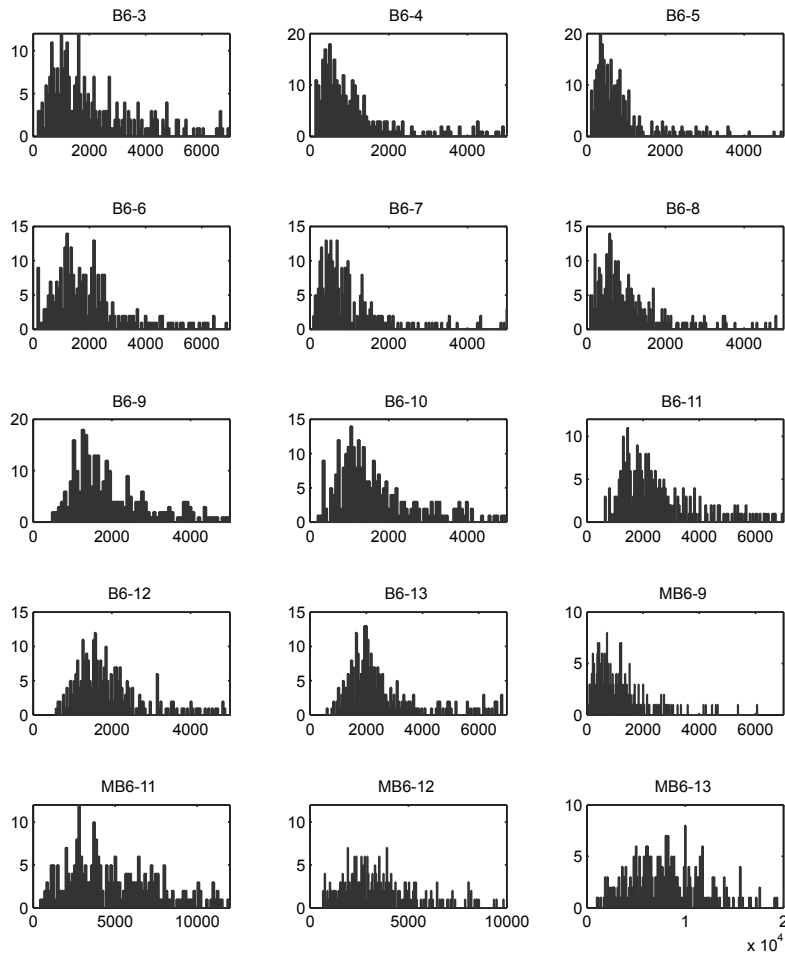


Abbildung 8: Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von gesunden C57BL/6 Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

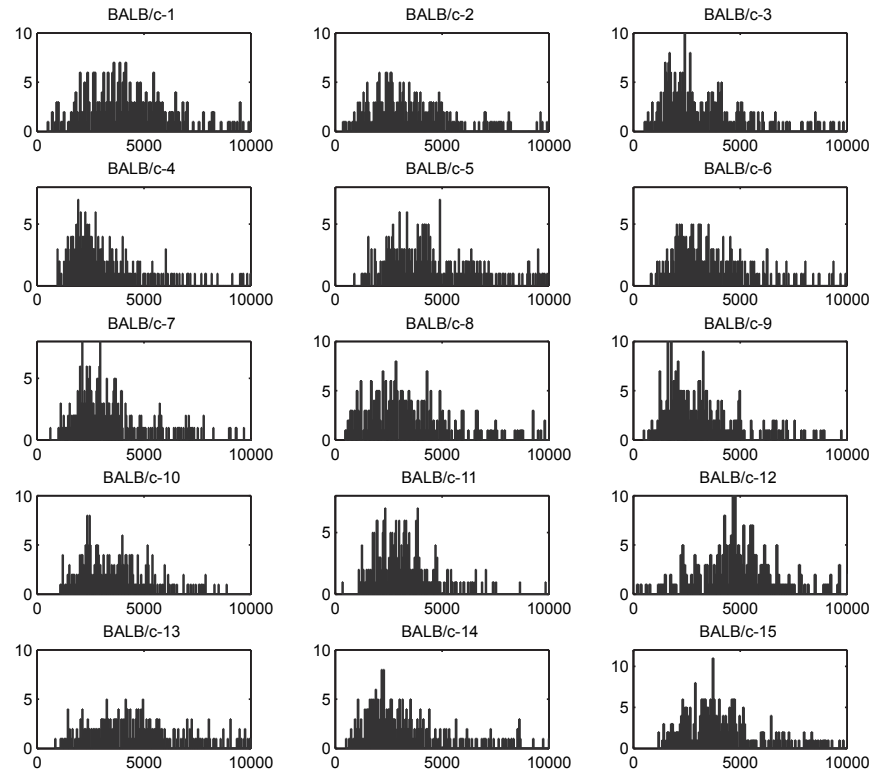


Abbildung 9: Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von gesunden BALB/*c* Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

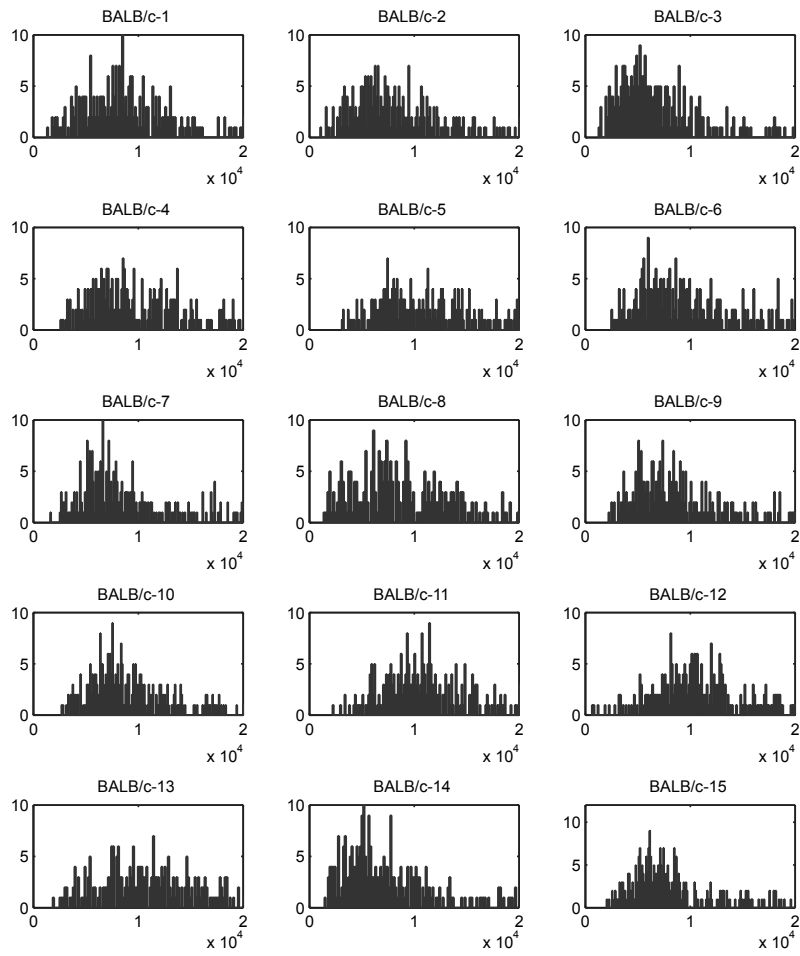


Abbildung 10: Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von gesunden BALB/c Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

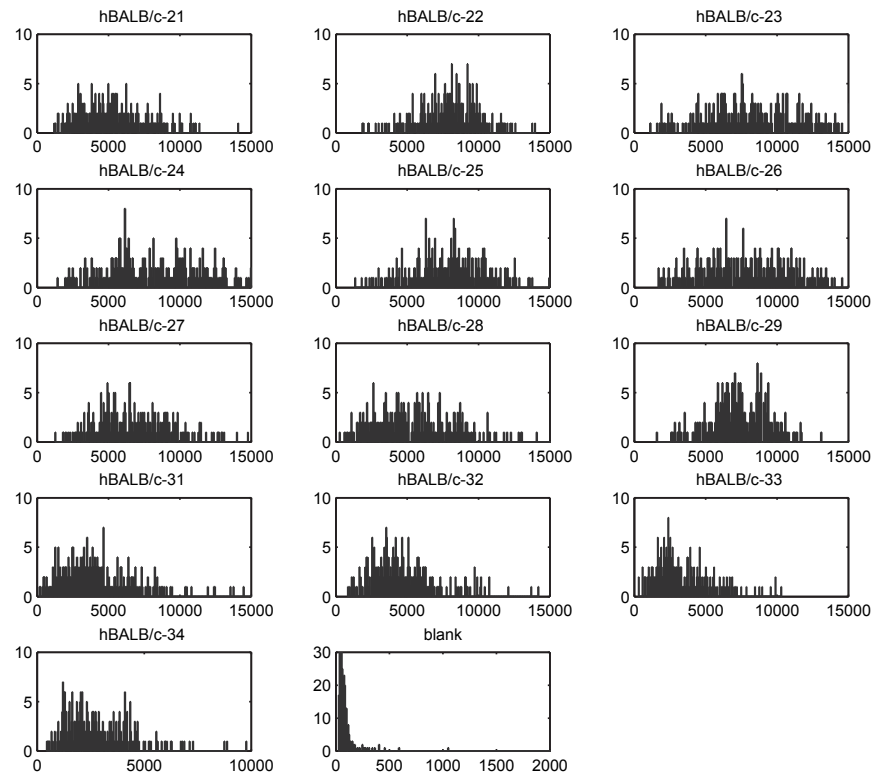


Abbildung 11: Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von *H.polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen (14dpi) gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} , sowie einer Blank-Inkubation.

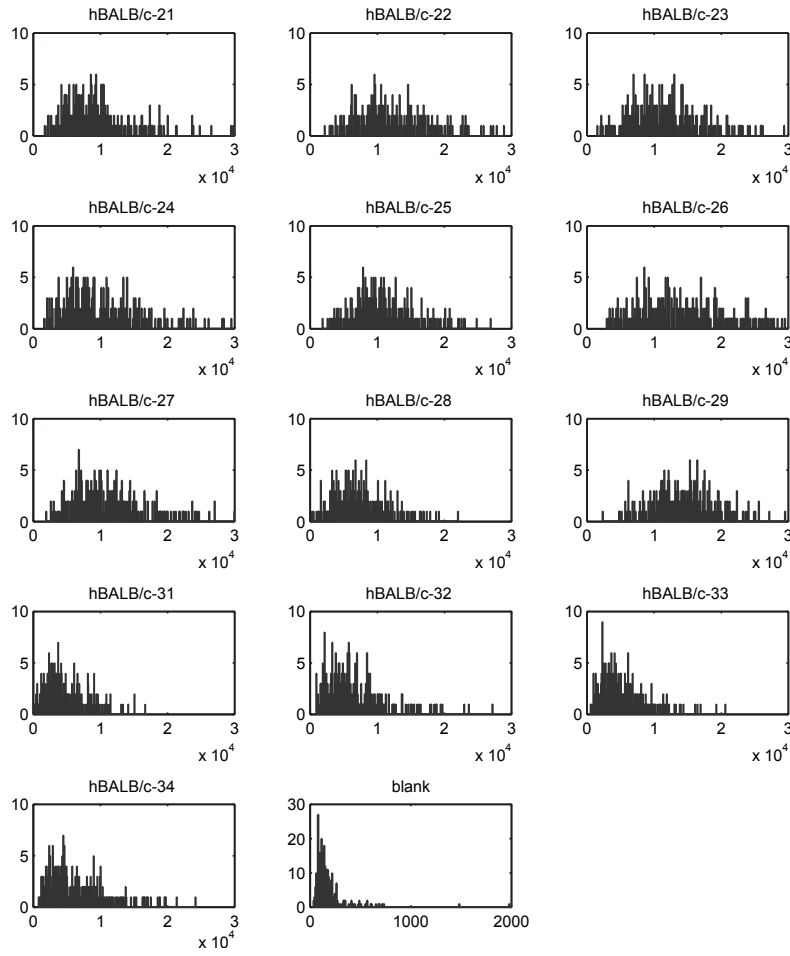


Abbildung 12: Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von *H. polygyrus*-infizierten BALB/c Mäusen (14dpi) gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} , sowie einer Blank-Inkubation.

Tabelle 8: Die Sequenzen der 300 Peptide, die für die Diagnose der *H. polygyrus*-Infektion verwendet wurden.

KCQVPTVWIAAFHQ	EAGMQDDQFQKHYP	YDDDWRKKAYTKP	AKLRANTTWNPVYQ
LPTATGNMQSVPLI	VRKVRTWRCPVVDG	KFWDGHRHAMKEMS	NTVSSNVGKQFNYI
ANHYKDGESEKAN	ESQIDQGGWLSEHI	KYEDDGVRRTKND	PAYRDGRDKLCSFK
VDFVAEPVKLPENQ	INLATSDETSFGN	KEKKYDNGPTSRL	RPEIHAGSARFSED
VIYDMEYSECYSVG	GKSSQYQSDIDLQ	HRLDWNEMYSANA	QDDTCETWIEADDN
SKWEVYECEPQRAA	YLPVFAHYVDSCDA	KHTGMAFKPVEYFW	SERFKTSKLLTSEY
TQELYTDPYERITH	TRRYNIMSKIFNTW	GVRHDLWNDAPSNF	PSPKSSLRPATSF
IYKLYRSACGALRD	VLRHEHSYTESRY	LLVEITRLKGHKWY	TDSQLWYLQKIDK
RYPANDWRTNSEEI	VIVPRINEHYHKFN	ASWDCGDDMDSYWS	ALITVHVDSELLVM
KKASEPRDNFKALS	ESTFVYQENDLRLN	AELKLNKDVRYGFF	QTEDEVKRNPNIEV
SHHFNWMNLMAVQY	VGVSFGSYDNQTHY	EVWTPPLDHFPHWY	LFSNGTVTRPKYSY
AHPKWGNVLSFFNA	PPNEWMDDWQPGEN	EFFLMFEDWKWENL	DKRTMDGTYDIKYD
SRAGPFAAPKVPAD	HRELQIFSERTRHQ	FKNHIAGAPYEFYN	KQAPKEKGYSKDEW
IEKQITNYPGAKH	SGFPDKIEFPTQDC	IMGWRVTRNYDVHH	QAAYFHGERSAAGS
NDQKREKCRGLPLG	LVTDAARTKYKEGV	HLLEGHFVREEQH	ARDLISIWMPQGP
NTFLHANCWVAIHG	NWTCKNQVIWEEMS	PNRLQDGKQWNTSN	REDLRIKPEEEGQ
QEYGLNLIAITFQH	VVTIKTITKKDMVN	FFDEIIHSCRSQNG	QHKNWEDESQFKR
EIEAFLNPRMGQPP	APYIHKMAPMVLWA	DSTSGPVKTKAPVQ	SKYKKKTYEQYDGK
TPNFIFLPIFYFYGR	SPDMKNTNVAIYGS	VTPRSNTPLRVQLK	PDWLTILYSFWFES
STDDYEDAASQGETE	YFMVIYFALISAYD	EYRKLTVQWYQPEE	FRTETKRAQQHPTG
VEQVVSRRKFGWK	LNMPKSENYCRIRV	VSLASSSARGDTYF	VTDTHSGDSSSNLK
SAPLVVPPPLNGIL	SDPWTWGHHSPLDL	YVWVKILIYYAPHL	RDQARQSVPCIRVK
WKRHYWQTTPMFM	TDVLPNYIKAMNGH	GETRNPMMWLVGAG	KEEKSEEEHEGFRD
IDRWPKTEHTRPD	NVQGDVFNLSYIS	VRFTLMEITTYVMS	NSFEVGDGPNEIYD
QSFTQKNNAIQFNK	KAHLSLNLRFNCT	EPLESAVDVYTKCG	FWDGHRHAMKEMCG
YNCKRMYEVAVCNR	ATYDRNGMLWAWTR	PVHYDFTFELILRM	VHADTGGNVRGVKY
RSRRKAEFMHAFTQ	FYHMFQKQHQLPW	PDNMKTRIVAGIAR	RQNRGIERRAAKLG
RHFFQVWNIRQCEN	TQISFVVPYNSPLS	AFYLRTAHKPVVHR	YGEDHRRDKKPGQE
DTDAGTLTAQGSRH	QDFHRASTNREP	SITSFQDMRAPTSQ	QQAQKIGKETTIELD
LDTFFSKVWYNLYH	NYLYNEILSMNKFR	EHSWVIFWGIHNT	PNTYERDAFNSYST
RRQIKQTLDSDEVY	KNRADQTTSPIHFA	QQRKTRVKEKRALG	GQFRVIGPGYPIRALVGDE
IHAKYVAKFINNLV	EPMRHSIRGWNQSQ	EIWASYFVDIRSMY	ALVGDEAELPCRISPGKNAT
EEENPTRERPKEG	TIVNHRGKAENADK	HPTKYTLPKYGVSN	EALPCRISPGKNATGMEVG
PERNSTLPPNYLIS	IPQWWQDDETAPF	DQVLNPISKAKLDK	CRISPGKNATGMEVGW
QHDNTYRHLAWDYF	DDKLKGKSPIKSFD	QKDTSRKNNKEQGL	SPGKNATGMEVGWYRSPFSR
YEKNGTRKRPRGAV	NKAGWVVELAAKVY	CDVKDIGFLLQPG	ATGMEVGWYRSPFSRVVHL
VFDLQTNQDAHQLH	MYRQKQVHTDLFPA	SSYQDKTTHKQYPF	NATGMEVGWYRSPFSRVV
SEVSWKENVPDEDD	NTTDSVKGNAKMD	SNYEGRDVHPIANA	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNG

NTMNWHLGCDPFPL	YPKNCIVLLFEWQD	SVLYKPMGNARQR	YRSPFSRVVHLYRNGK
SRRPMHHPDDPHT	GYLVDDHAGLIATY	KHDKPENDVVYQKL	GWYRSPFSRVVHLYRNGKDQ
AINQRENHEKVEHG	KFIELTQTARKCAT	QQTWSESDTCDDDY	PFSRVVHLYRNGKDQDAE
LAEVHDHYMRGQDPR	RFRGTCPMWKCHFL	NNMLKVTSNLSRD	KDQDAEQAPEYRGRTTELLKE
EMKDAFGHLHGIRC	FQETGRFHTKSVCA	RELLKCLDQMGVNY	EQAPEYRGRTTELLKET
VPFEFEIDFAQAQN	KIIQAKFHPNWDNH	MYACNKALKNFTPN	PEYRGRTTELLKETISEGKVT
KYTLSHSHWKIAMA	FIREINGRHWKTLR	GLDKIKNNVKAHKL	RTELLKETISEGKVTLRIQN
RSSYHGKYGQSPMS	FCTVLKMRFPQQWR	WSYSEYVDTLNNAE	KETISEGKVTLRIQNVRF
LFKTDGRGVAHRTMD	SFSWYRDFSRPNIN	TAATKLHRPIRRGS	VTLRIQNVRFSDGGYTCTFF
VDEEREGPQLERHC	MNDPSQVSSFLKKT	HSRDWATIRYCTNN	DEGGYTCTFFRDHSYQEEAAM
YQQQRTSISSEKWAD	LLMKYAFDDRQAEW	PTQEPRKVHNSDEM	TCFFRDHSYQEEAAMELKVE
DAAHKHHRDLGGQH	SHWNKRSLGAQPYY	VTVSALGTDTVASV	DHSYQEEAAMELKVEDPFY
YRRKKRKQKYNQKV	KMIVQDIAWPWYGS	DCQLWYLQQKIDKF	GLLECCARCLVGAPFASLV
HDDFQGPWTWPNT	FYQQQFWQRFSECA	QHPEGDQNRSTRGP	LVGAPFASLVATGLCFFGVA
NYHMGDVEKPPGRT	AIGKWLDYKGMMPH	KELDLEHKPRLHIT	FSKNYQDYEYLINVIHAFQY
KSTHHESWLKIVDY	SMSTQAAGNECAEI	FVPWDTKRIFTTVD	LINVIHAFQYVIYGTASFFF
QMPGLMYHTMAHNF	HSDKTIKTYTKMLR	NVFNSYGPLTTFSH	HCLGKWLGHDPKF
LTKFENNETDSSNA	YSDKTYTDRPRQ	KGTINFVADHHPDN	NTWTTCSIAFPK
SAAQSKSKRGGSET	GTKDEQDISDFRAA	LARDFRDTRDVSRE	PGKVCGSNLLSICKTAEF
DLICFSTVVRPFFG	WDPFCGEWKHAPDY	NEPLESAVDVYTKS	ASQKRPSQRSKYLATASTM
KPSASNYWKDWIER	RIQRHSQTTVEEDD	DDEDSTSENNLEKK	SKYLATASTM DHARHGFLPR
AKNENTRYFGNYTG	MDGRPESPSTMAKW	VRQVQRSKKMHKKG	ARHGFLPRHRDTGILDSIG
HCPFMYNRCRDADC	DVTDTKLVYATYRE	LDKRRQHNYLFVAV	ILDSIGRFFSGDRGAPKRG
PYFNLQLKDRSDLN	EKAIAQPRYSHRPM	RTSCSEDIDATRKN	GRFFSGDRGAPKRGSGKVPW
DGSSLSQTYNPEYY	RSIEGDSYPKSNDN	TQPRKTAMINWFYK	GDRGAPKRGSGKVPWL
TGGPWLAGEWAPG	RTDTAFVNPAGWT	KQNQSRVNPQISLG	DRGAPKRGSGKVPWLQSR
TQSHFHKGDVGLK	TERIKSELLGQNTK	GSPCRRVQDNAAKS	KRGSGKVPWLQSRSP
HMKHYEERERVVWI	NVDQSVKYHRVHSD	THEDFRYDDVFEGN	RGSGKVPWLQSRSPPLSH
DVCSWTSSDMTNMG	NRGLTDAYGAETRL	FRALKYTQWERHDE	WLKQSRSPPLSHARSRPLC
ALFIFAERDPMKGV	KTNYTNTAKNVKSI	GGDGGGEQDMKVQY	RSPLPSHARSRPLCHMY
SVWRSFGEHAAWHE	SVQFWFRQGREQTG	FKTRVQDGSPWKTA	GLCHMYKDSHTRTTTHYGS
DQERCEQPDRRIKD	KCINKTWISGWYD	KDGREKQDPEFTIT	TRTTTHYGSPLQKSQHGR
RQLGQPPLSTFPE	RSPQDMLTGFWLAH	STTIDQGSQMKSPV	YGSPLQKSQHGR
RLSATENELRQGRP	DPFKRGSGPKNDLL	KAWSDMRLLPHEFK	ENPVVHFFKNIVTPRTP
GFRKDHSPPFNRND	RKSYNKRRDKTGPE	NKMCGIRGPGSGCDE	GRASDYKSAHKGFKGAYDAQ
NFSDAVYIVRIIIS	GDQNHQVDSIEPWY	TKPKEDKDKVKLSA	YKSAHKGFKGAYDAQGTL
KRMRTINFRSUNAQ	LDEEVFTFENLRIY	KFREAGLFHNGIAR	SYDSIKLEPENPPPYEEA

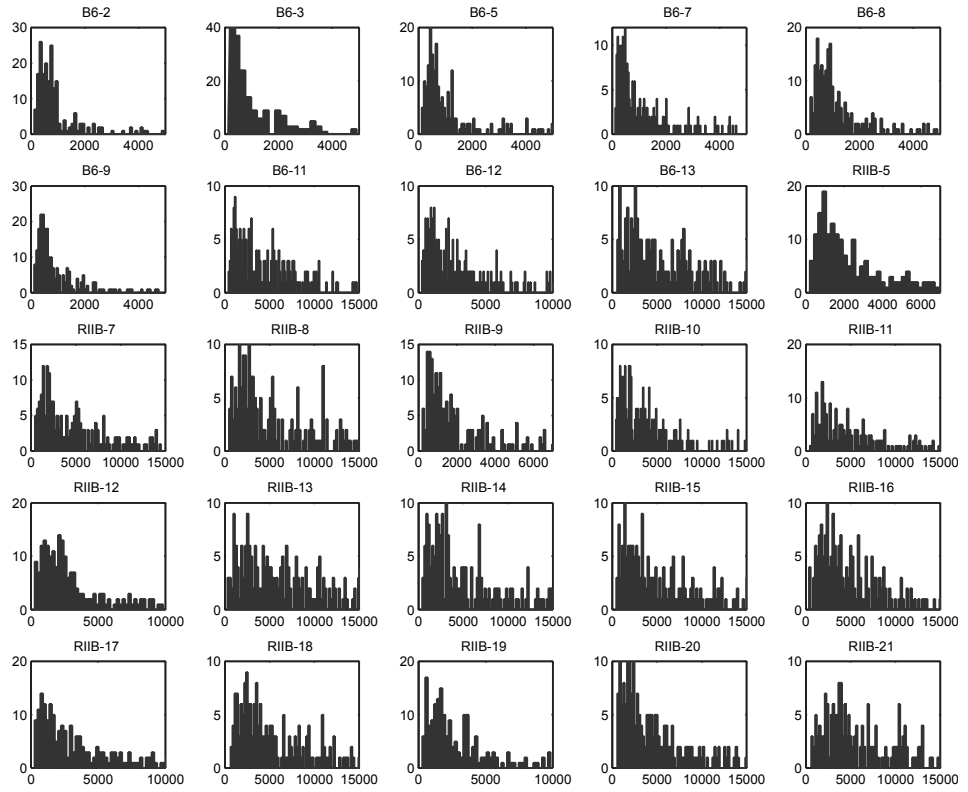


Abbildung 13: Signalintensitätshistogramme der IgG2c-Bindungssignale von gesunden C57BL/6 Mäusen und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

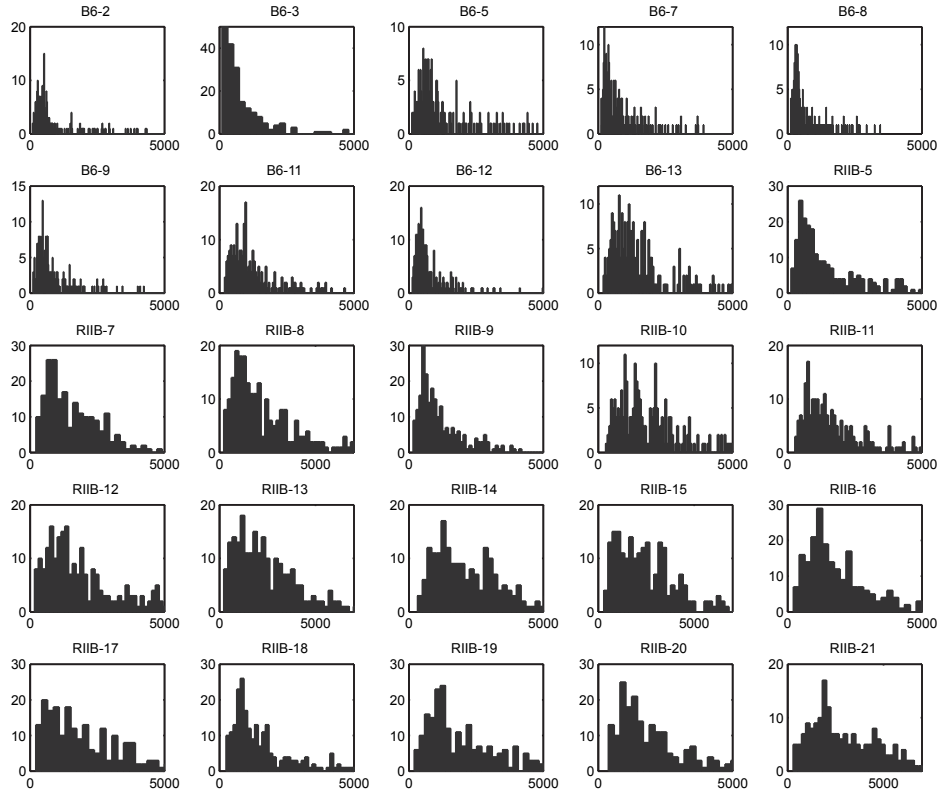


Abbildung 14: Signalintensitätshistogramme der IgG2b-Bindungssignale von gesunden C57BL/6 Mäusen und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$.B6 Mäusen gegenüber Peptidbibliothek P_{14+}^{300} .

Tabelle 9: Die Sequenzen der 242 Peptide, die für die Unterscheidung der IgG2b- Autoantikörperreper-toires von gesunden und autoimmunen Mäusen verwendet wurden.

KCQVPTVWIAAFHQ	SDPWTWGHSLPDL	LFSNGTVTRPKYSY	KMIVQDIAPWYGS
LPTATGNMQSVPLI	TDVLPNYIKAMNGH	DKRTMDGTYDIKYD	FYQQQFWQRFSECA
ANHYKDGESEKAN	NVQGDFWLVNSYIS	KQAPKEKGYSKDEW	SMSTQAAGNECAEI
VDFVAEPVKLPENQ	KAHLSLNLNRFNCT	QAAYFHGERSAAGS	YSDKKTYTDTTRPRQ
VIYDMEYSECYSVG	LDTFFSKVWYNLYH	FRTEKRAQQHPTG	GTKDEQDISDFRAA
YLPVFAHYVDSFDA	NTFLHANCWVAIHG	RDQARQSVPCIRVK	WDPFCGEWKHAPDY
TRRYNIMSKIFNTW	QEYLGNIATFQH	KEEKSEEEHEGFRD	RIQRHSQTTVEEDD
VLREHSYTESRY	EIEAFLNPRMGQPP	NSFEVGDGPNEIYD	DVTDTKLVYATYRE
VIVPRINEHYHKFN	STDDYEDAASQGTE	YGEDHRRDKKPGQE	RSIEGDSYPKSNND
ESTFVYQENDLRLN	SAPLVPPPLNGIL	QKAKIGKETTIELD	RTDTAFVAPNAGWT
VGVSTGSYDNQTHY	IDRKWPKTEHTRPD	PNTYERDAFNSYST	TERIKSELLGQNTK
PPNEWMDDWQPGEN	QSFTQKNNAIQFNK	HPTKYTLPKYGVSN	NVDQSVKYHRVHSD
HRELQIFSERTRHQ	RHFFQVWNIRQCEN	QKDTSRKNNKEQGL	NRGLTDAYGAETRL
SGFPDKIEFPTQDC	DTDAGTLTAQGRH	CDVKDIGFGLQPG	KTNNTAKNVKSI
LVTDAARTKYKEGV	EAGMQDDQFQKHYP	SSYQDKTTHKYQPF	AKLRANTTWNVPYQ
NWTCKNQVIWEEMS	VRKVRTWRCPVVDG	SNYEGRDVHPIANA	NTVSSNVGKQFNYI
SKEWVYECEPQRAA	ESQIDQGGWLSEHI	SVLYKPMGNARQR	RPEIHAGSARFSED
TQELYTDPYERITH	INLATSDETSNPGN	KHDKPENDVVYQKL	QDDTCETWIEADDN
IYKLYRSACGALRD	GKSSQYQSDIDLQ	QQTWSESDTCDDY	SERFKTSKLLTSEY
RYPANDWRTNSEEI	GVRHDLWNDAPS NF	NNMLKVTSNLSRD	PSPKSSSLRPATSF
KKASEPRDNFKALS	EVWTPPLDHFPWHY	RELLKCLDQMGVNY	TDSQLWYLQKIDK
SHHFNWMNLMAVQY	EFFLMFEDWKWENL	GLDKIKNNVKAHKL	YDDDWRKKAYTKP
AHPKWGNVLSFFNA	FKNHIAGAPYEFYN	WSYSEYVDTLNNAE	KYEDDGVNRRTKND
SRAGPFAAPKVPAD	HLLEGHFVREEQH	HSRDWATIRYCTNN	KEKKYDNGPTSRAL
IEKQITNYPGAKH	PNRLQDGKQWNTSN	PTQEPRKVHNSDEM	HRLDWNMGMSANA
NDQKREKCRGLPLG	FFDEIIHSCRSQNG	VTVSALGTDTVASV	QTEDEVKRNPNIEV
FYHMFQKQHQPLW	DSTSGPVKTKAPVQ	ARDLISIWWMPQGP	LINVIHAFQYVIYGTASFFF
TQISFVVPYNSPLS	VTPRSNTPLRVQLK	REDLRIKRPEEEGQ	HCLGKWLGHDPKF
QDFHRASTNREP DV	EYRKLTQWYQPEE	QHKNWEDESGQFKR	NTWTTCCSIAFPSK
NYLYNEILSMNKFR	VSLASSSARGDTYF	SKYKKKTYEQYDGK	PGKVCGSNLLSICKTAEF
RRQIKQTLDSDEVY	YVWVKILIYYAPHL	PDWLTILYSFWFES	ARHGFLPRHRTGILDSIG
DGSSLSQTYNPEYY	IHAKYVAKFINNLV	GETRNPHMWLVGAG	ILDSIGRFFSGDRGAPKRG
TGGPWLAGEWAPG	EEENPTRERPKEG	VRFTLMEITYTVMS	GRFFSGDRGAPKRGSGKVPW
TQSHFHKGDVGLK	PERNSTLPPNYLIS	EPLESAVDVYTKCG	GDRGAPKRGSGKVPWL
HMKHYEERERVVWI	QHDNTYRHLAWDYF	PVHYDFTFELILRM	DRGAPKRGSGKVPWLKQSR
DVCSWTSSDMTNG	YEKNGTRKRPRGAV	AFYLRTAHKPPVHR	KRGSGKVPWLKQSRSP
ALFIFAERDPMKGV	VFDLQTNQDAHQLH	SITSFQDMRAPTSQ	RSGSGKVPWLKQSRSPLSH

SVWRSFGEHAAWHE	SEVSWKENVPDEDD	EHSWVIFWGIHNT	TRTTHYGSLPQKSQHGRQTQD
DQERCEQPDRRIKD	NTMNWHLGCDFPFL	KNRADQTTSPHFWA	YGSLPQKSQHGRQTQDE
RQLGQPPLLSTFPE	SRRPMHHDPPDPHT	TIVNHRGKAENADK	ENPVVHFFKNIVTPRTP
RLSATENELRQGRP	AINQRENHEKVEHG	IPQWWQQDHETAPF	GRASDYKSAHKGFKGAYDAQ
GFRKDHSPPFNRND	LAEVDHYMRGQDPR	DDKLGKGSPIKSF	YKSAHKGFKGAYDAQGTL
NFSDAVYIVRIIIS	EMKDAFGHLHGIRC	NKAGWVVELAAKVY	SYDSIKLEPENPPPYEEA
SPDMKNTNVAYIGS	VPFEFEIDFAQAQN	NTTDTSVKGNMAKD	GQFRVIGPGYPIRALVGDE
YFMVIYFALISAYD	KYTLSHSHWKIAMA	YPKNCIVLLFEWQD	ALVGDEAELPCRISPGKNAT
KQNQSRVPNQISLG	RSSYHGKYGQSPMS	GYLVDDHAGLIATY	EAELPCRISPGKNATGMEVG
GSPCRRVQDNAAKS	LFKTDRGVAHRTMD	KFIELTQTARKCAT	CRISPGKNATGMEVGW
THEDFRYDDVFEGN	VDEEREGPQLERHC	FQETGRFHTKSVCA	PFSRVVHLRNGKDQDAE
FRALKYTQWERHDE	YQQQRTSISSEKWD	KIIQAKFHPNWDNH	KDQDAEQAPEYRGRTTELLKE
GGDGGGEQDMKVQY	DAAHKHHRDLGGQH	LLMKYAFDDRQAEW	EQAPEYRGRTTELLKET
FKTRVQDGSPWKTA	YRRKKRKQKYNQKV	DCQLWYLQQKIDKF	PEYRGRTTELLKETISEGKVT
KDGREKQDPEFTIT	HDDFQGPTWVPNTE	QHPEGDQNRSTRGP	RTELLKETISEGKVTLRIQN
STTIDQGSQMKSPV	NYHMGDVEKPPGRT	KELDLEHKPRLHIT	KETISEGKVTLRIQNVRF
NKMCGIRGPGSCDE	KSTHHESWLKIVDY	FVPWDTKRIFTTVD	VTLRIQNVRFSEGGYTCTFF
TKPKEDKDKVKLSA	LTKFENNETDSSNA	NVFNSYGPLTTFSH	DEGGYTCTFFRDHSYQEEAAM
KFREAGLFHNGIAR	SAAQSKSKRGGSET	KGTINFVADHHPDN	TCFFRDHSYQEEAAMELKVE
KCINKTWISGWYD	DLICFSTVVRPFFG	LARDFRD TDVDSRE	DHSYQEEAAMELKVEDPFY
RSPQDMLTGFWLAH	KPSASNYKDWIER	NEPLESAVDVYTKS	GLLECCARCLVGAPFASLV
DPFKRGSGPKNDLL	AKNENTRYYFGNYTG	DDEDSTSENNLEKK	LVGAPFASLVATGLCFFGVA
HCPFMYNRCRDADC	LDKRRQHNYLFVAV	GDQNHQVDSIEPWY	
PYFNQLQKDRSDLN	RTSCSEDIDATRKN	LDEEVFTFENLRIY	

Tabelle 10: Die Sequenzen der 233 Peptide, die für die Unterscheidung der IgG2c- Autoantikörperreper-toires von gesunden und autoimmunen Mäusen verwendet wurden.

KCQVPTVWIAAFHQ	HCPFMYNRCRDADC	FQETGRFHTKSVCA	KEEKSEEEHEGFRD
LPTATGNMQSVPLI	PYFNQLQKDRSDLN	LLMKYAFDDRQAEW	NSFEVGDGPNEIYD
ANHYKDGESEKAN	DGSSLSQTYNPEYY	DCQLWYLQQKIDKF	RQNRGIERRAAKLG
VDFVAEPVKLPENQ	TGGPWLAGEWAPG	QHPEGDQNRSTRGP	YGEDHRRDKKPGQE
VIYDMEYSECYSVG	TQSHFHKGDKVGLK	KELDLEHKPRLHIT	QQAKIGKETTIELD
YLPVFAHYVDSFDA	HMKHYEERERVVWI	FVPWDTKRIFTTVD	PNTYERDAFNSYST
TRRYNIMSKIFNTW	DVCSWTSSDMTNMG	NVFNSYGPLTTFSH	HPTKYTLPKYGVSN
VLREHSYTESRRY	SVWRSFGEHAAWHE	KGTINFVADHHPDN	QKDTSRKNNKEQGL
VIVPRINEHYHKFN	DQERCEQPDRRIKD	LARDFRDTDVDSRE	CDVKDIGFGLLPQG
ESTFVYQENDLRLN	RQLGQPPLLSTFPE	NEPLESAVDVYTKS	SSYQDKTTHKQYPF
VGVSTGSYDNQTHY	RLSATENELRQGRP	DDEDSTSENNLEKK	SNYEGRDVHPIANA
PPNEWMDDWQPGEN	GFRKDHSPPFNRND	RTSCSEDIDATRKN	KHDKPENDVVYQKL
HRELQIFSERTRHQ	NFSDAVYIVRIIS	KQNQSRVNPQISLG	QQTWSESDTCDDDY
SGFPDKIEFPTQDC	SPDMKNTNVAYIGS	GSPCRRVQDNAAKS	NNMLKVTSNLSRD
LVTDAARTKYKEGV	YFMVIYFALISAYD	THEDFRYDDVFEGN	RELLKCLDQMGVNY
NWTCKNQVIWEEMS	SDPWTWGHHSPLDL	FRALKYTQWERHDE	GLDKIKNNVKAHKL
SKEWVYECEPQRAA	TDVLPNYIKAMNGH	GGDGGGEQDMKVQY	WSYSEYVDLTENAE
TQELYTDPYERITH	NVQGDWFLNVSYIS	FKTRVQDGSPWKTA	HSRDWATIRYCTNN
IYKLYRSACGALRD	KAHLSLNLNRFNCT	KDGREKQDPEFTIT	PTQEPRKVHNSDEM
RYPANDWRTNSEEI	NTFLHANCWVAIHG	STTIDQGSQMKSPV	VTVSALGTDTVASV
KKASEPRDNFKALS	QEYLGNIATITFQH	NKMCGIRGPSGCDE	ARDLISIWMPQGP
SHHFNWMNLMAVQY	EIEAFLNPRMGQPP	TKPKEDKDKVLSA	REDLRIKRPEEEGQ
AHPKWGNVLSFFNA	STDDYEDAASQGE	KFREAGLFHNGIAR	QHKNWEDESGQFKR
SRAGPFAAPKVPAD	SAPLVPPPLNGIL	RSPQDMLTGFWLAH	SKYKKKTYEQYDGK
IEKQITNYPGAKH	IDRWPKTEHTRPD	DPFKRSGSPKNDLL	GQFRVIGPGYPICALVGDE
NDQKREKCRGLPLG	QSFTQKNNAIQFNK	GDQNGHVDSIEPWY	ALVGDEAELPCRISPGKNAT
FYHMFQKQHQLPW	RHFFQVWNIRQCEN	LDEEVFTFENLRIY	EAELPCRISPGKNATGMEVG
TQISFVVPYNSPLS	DTDAGTLTAQGSRH	KMIVQDIAWPWYGS	CRISPGKNATGMEVGW
QDFHRASTNREPDV	EAGMQDDQFQKHYP	AIGKWLDYCGKMPH	PFSRVVHLRYRNGKDQDAE
NYLYNEILSMNKFR	VRKVRTWRCPVVDG	SMSTQAAGNECAEI	KDQDAEQAPEYRGRTELLKE
RRQIKQTLDSDEVY	ESQIDQGGWLSEHI	YSDKKTYTDTRPRQ	EQAPEYRGRTELLKET
IHAKYVAKFINNLV	INLATSDTEDSPGN	GTKDEQDISDFRAA	PEYRGRTELLKETISEGKVT
EEENPTRERPKERG	GKSSQYQSDIDLQ	WDPFCGEWKHAPDY	RTELLKETISEGKVTLRIQN
PERNSTLPPNYLIS	GVRHDLWNDAPS NF	RIQRHSQTTVEEDD	KETISEGKVTLRIQNVRF
QHDNTYRHLAWDYF	EVWTPPLDHFPWHY	DVTDTKLVYATYRE	VTLRIQNVRFSEGGYT CFF
YEKNGTRKRPRGAV	FKNHIAGAPYEFYN	RSIEGDSYPKSNDN	DEGGYT CFFRDHSYQEEAAM
VFDLQTNQDAHQLH	HLLEGHFVREEQH	RTDTAFVNPAGWT	TCFFRDHSYQEEAAMELKVE
SEVSWKENVPDEDD	PNRLQDGKQWNTSN	TERIKSELLGQNTK	DHSYQEEAAMELKVEDPFY
NTMNWHLGCDFPFL	FFDEI IHSCRSQNG	NVDQSVKYHRVHSD	GLLECCARCLVGAPFASLV

SRRPMHHPDDPHT	DSTSGPVKTKAPVQ	NRGLTDAYGAETRL	LVGAPFASLVATGLCFFGVA
AINQRENHEKVEHG	VTPRSNTPLRVQLK	KTNYTNTAKNVKSI	HCLGKWLGHDPKF
LAEVDHYMRGQDPR	EYRKLTQWYQPEE	AKLRANTTWNVPVYQ	NTWTTCSIAFPSK
EMKDAFGHLHGIRC	VSLASSSARGDTYF	NTVSSNVGKQFNVI	PGKVCGSNLLSICKTAEF
VPFEFEIDFAQAQN	GETRNPHMWLVGAG	RPEIHAGSARFSED	ARHGFLPRHRDTGILDSIG
KYTLSHSWHKIAMA	VRFTLMEITYTVMS	QDDTCETWIEADDN	ILDSIGRFFSGDRGAPKRGS
RSSYHGKYGQSPMS	EPLESAVDVYTKCG	SERFKTSKLLTSEY	GRFFSGDRGAPKRGS
LFKTDRGVAHRTMD	PVHYDFTFELILRM	PSPKDSSLRPATSF	GDRGAPKRGS
VDEEREGPQLERHC	AFYLRTAHKPVVHR	TDSQLWYLQQKIDK	DRGAPKRGS
YQQQRTSISSKWAD	SITSFQDMRAPTSQ	YDDDWDRKKAYTKP	KRGSGKVPWLKQSRSP
DAAHKHHRDLGGQH	EHSDWVIFWGIHNT	KYEDDGVNRRTKND	RGS
YRRKKRKQKYNQKV	KNRADQTTSPHFWA	HRLDWNEMYSANA	TRTTHYGSLPQKS
HDDFQGPTWVPNTE	TIVNHRGKAENADK	QTEDEVKRPNIEV	YGSLPQKS
NYHMGDVEKPPGRT	IPQWWQDHETAPF	LFSNGTVTRPKYSY	ENPVVHFFKNIVTPRTP
KSTHHESWLKIVDY	DDKLGKGSPIKSFD	DKRTMDGTYDIKYD	GRASDYKSAHKGFKGAYDAQ
LTKFENNETDSSNA	NKAGWVVELAAKVY	KQAPKEKGYSKDEW	YKSAHKGFKGAYDAQGTL
SAAQSKSKRGGSET	NTDTSVKGNMAKD	QAAYFHGERSAAGS	SYDSIKLEPENPPPYEEA
DLICFSTVVRPFFG	YPKNCIVLLFEWQD	FRTETKRAQQHPTG	
KPSASNYWKDWIER	GYLVDDHAGLIATY	VTDTHSGDSSSNLK	
AKNENTRYFGNYTG	KFIELTQTARKCAT	RDQARQSVPCIRVK	

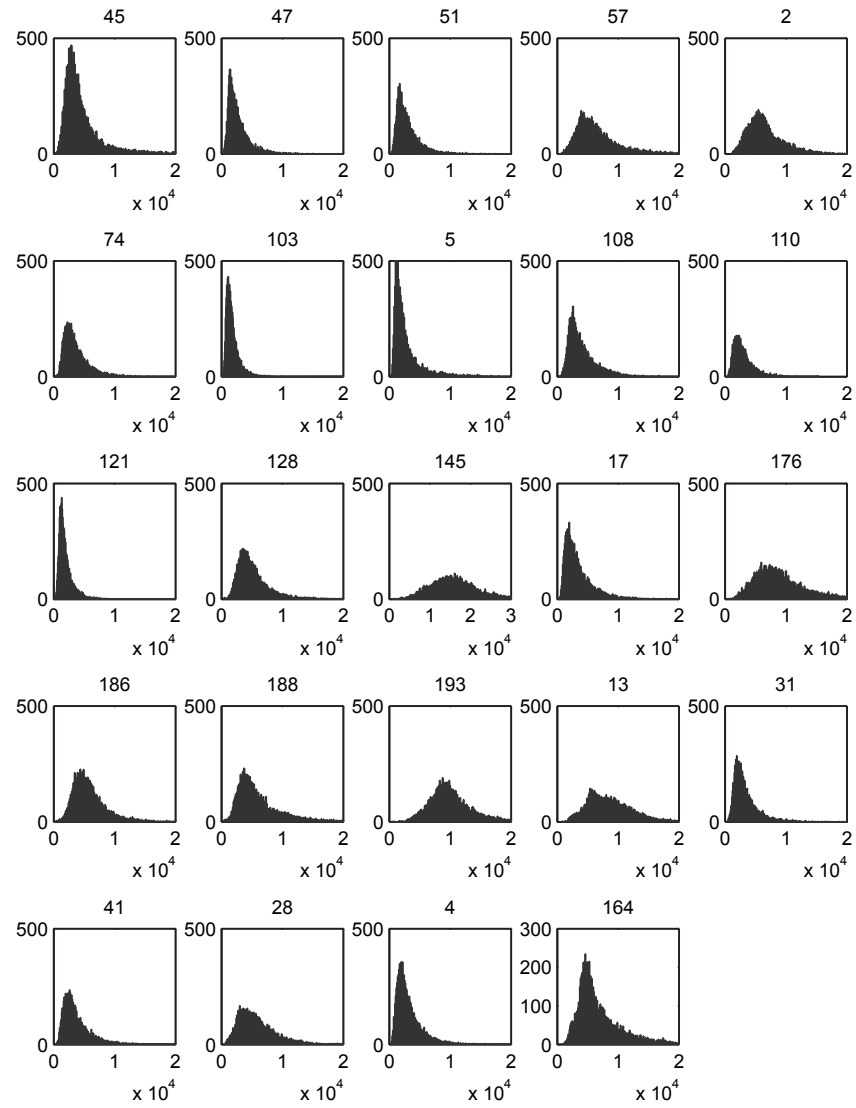


Abbildung 15: Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von *hA*-Patienten gegenüber Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$.

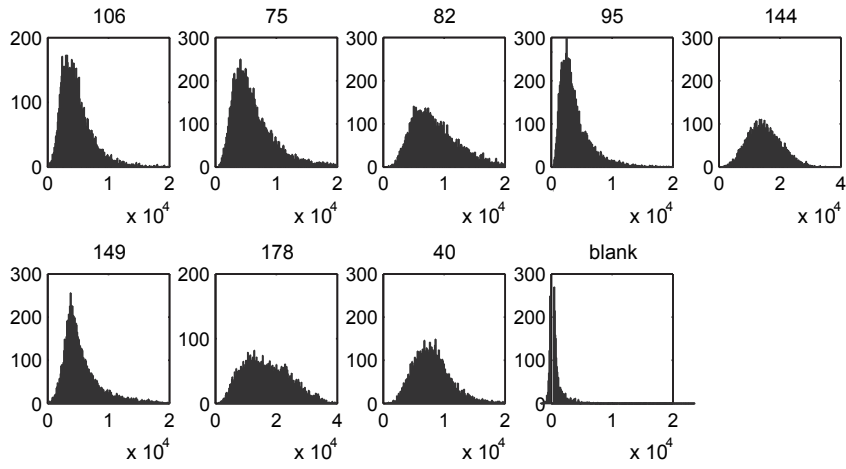


Abbildung 16: Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von nA -Patienten gegenüber Peptidbibliothek $P_{13,15}^{9182}$, sowie einer Blank-Inkubation.

Literaturverzeichnis

- [1] R. C. Aalberse, I. Kleine Budde, S. O. Stapel, and R. van Ree. Structural aspects of cross-reactivity and its relation to antibody affinity. *Allergy*, 56(67):27–29, 2001.
- [2] D. N. Abakushin and A. M. Poverenny. Histones interact with immunoglobulins and give them polyspecificity. *Immunol Lett*, 53(2-3):95–99, 1996.
- [3] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17):3389–3402, 1997.
- [4] S. F. Altschul, J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schäffer, and Y. Yu. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*, 272(20):5101–5109, 2005.
- [5] H. Andresen, K. Zarse, C. Grötzinger, J. M. Hollidt, E. Ehrentreich-Förster, F. F. Bier, and O. J. Kreuzer. Development of peptide microarrays for epitope mapping of antibodies against the human TSH receptor. *J Immunol Methods*, 315(1-2):11–18, 2006.
- [6] S. Di Angelantonio, C. Matteoni, E. Fabbretti, and A. Nistri. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci*, 17(11):2313–2322, 2003.
- [7] P. Angenendt, J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach, and D. J. Cahill. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical Biochemistry*, 309(2):253–260, 2002.
- [8] R. M. Anthony, L. I. Rutitzky, J. F. Urban, M. J. Stadecker, and W. C. Gause. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*, 7(12):975–987, 2007.
- [9] J. R. Appel, J. Buencamino, R. A. Houghten, and C. Pinilla. Exploring antibody polyspecificity using synthetic combinatorial libraries. *Mol Divers*, 2(1-2):29–34, 1996.
- [10] S. Avrameas, G. Dighiero, P. Lymberi, and B. Guilbert. Studies on natural antibodies and autoantibodies. *Ann Immunol (Paris)*, 134D(1):103–13, 1983.
- [11] N. V. Avseenko, T. Y. Morozova, F. I. Ataullakhanov, and V. N. Morozov. Immunoassay with multicomponent protein microarrays fabricated by electrospray deposition. *Anal Chem*, 74(5):927–933, 2002.

- [12] D. J. Barlow, M. S. Edwards, and J. M. Thornton. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, 322(6081):747–748, 1986.
- [13] J. M. Behnke, A. Lowe, S. Clifford, and D. Wakelin. Cellular and serological responses in resistant and susceptible mice exposed to repeated infection with *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. *Parasite Immunol*, 25(6):333–340, 2003.
- [14] A. Ben-Smith, F. N. Wahid, D. A. Lamm, and J. M. Behnke. The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG1 and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunol*, 21(8):383–395, 1999.
- [15] Benjamin and Perdue. Site-directed mutagenesis in epitope mapping. *Methods*, 9(3):508–515, 1996.
- [16] J. A. Berzofsky and A. N. Schechter. The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol Immunol*, 18(8):751–63, 1981.
- [17] M. Bidlingmaier and P.U. Freda. Measurement of human growth hormone by immunoassays: current status, unsolved problems and clinical consequences. *Growth Horm IGF Res*, 20(1):19–25, 2010.
- [18] S. Bolland and J. V. Ravetch. Spontaneous autoimmune disease in Fc[gamma]RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13(2):277–285, 2000.
- [19] S. Bolland, Y. S. Yim, K. Tus, E. K. Wakeland, and J. V. Ravetch. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcgammaRIIB(-/-) mice. *J Exp Med*, 195(9):1167–1174, 2002.
- [20] J. Bongartz, N. Bruni, and M. Or-Guil. Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. In U. Reineke, editor, *Epitope Mapping Protocols: Second Edition*. Humana Press, Totowa, NJ, 2nd edition, 2008.
- [21] C. A. Borrebaeck. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol Today*, 21(8):379–382, 2000.
- [22] N. Bruni. Informationsgewinnung mittels Bindungsanalysen von Serumantikörpern an Peptidbibliotheken. *Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin*, 2008.
- [23] F. M. Burnet. A modification of Jerne’s theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science*, 20:67–69, 1957.
- [24] J. L. Carey. Enzyme immunoassays for antinuclear antibodies. *Clin Lab Med*, 17(3):355–365, 1997.
- [25] M. C. Carroll. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5(10):981–986, 2004.
- [26] K. Cartledge, A. R. Dunn, and G. Scholz. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the Src-family kinase Hck. *Hybridoma*, 19(4):323–330, 2000.

- [27] L. Cekaite, O. Haug, O. Myklebost, M. Aldrin, B. Østenstad, M. Holden, A. Frigessi, E. Hovig, and M. Sioud. Analysis of the humoral immune response to immunoselected phage-displayed peptides by a microarray-based method. *Proteomics*, 4(9):2572–2582, 2004.
- [28] M. Chatterjee, S. Mohapatra, A. Ionan, G. Bawa, R. Ali-Fehmi, X. Wang, J. Nowak, B. Ye, F. A. Nahhas, K. Lu, S. S. Witkin, D. Fishman, A. Munkarah, R. Morris, N. K. Levin, N. N. Shirley, G. Tromp, J. Abrams, S. Draghici, and M. A. Tainsky. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer Res*, 66(2):1181–90, 2006.
- [29] M. Chiari, M. Cretich, A. Corti, F. Damin, G. Pirri, and R. Longhi. Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A. *Proteomics*, 5(14):3600–3603, 2005.
- [30] N. Comtesse, A. Zippel, S. Walle, D. Monz, C. Backes, U. Fischer, J. Mayer, N. Ludwig, A. Hildebrandt, A. Keller, W. I. Steudel, H. P. Lenhof, and E. Meese. Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27):9601–9606, 2005.
- [31] J. M. Conner and S. Varon. Characterization of antibodies to nerve growth factor: assay-dependent variability in the cross-reactivity with other neurotrophins. *J Neurosci Methods*, 65(1):93–99, 1996.
- [32] M. A. Cooper. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 1(7):515–528, 2002.
- [33] M. Cretich, F. Damin, G. Pirri, and M. Chiari. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. *Biomol Eng*, 23(2-3):77–88, 2006.
- [34] M. Cretich, R. Longhi, A. Corti, F. Damin, G. Di Carlo, V. Sadini, and M. Chiari. Epitope mapping of human chromogranin A by peptide microarrays. *Methods Mol Biol*, 570:221–232, 2009.
- [35] M. Cuzin. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol*, 8(3):291–296, 2001.
- [36] D. S. Daly, A. M. White, S. M. Varnum, K. K. Anderson, and R. C. Zangar. Evaluating concentration estimation errors in ELISA microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 6:17, 2005.
- [37] N.J. de Mol. Affinity constants for small molecules from SPR competition experiments. *Methods Mol Biol*, 627:101–111, 2010.
- [38] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, and P. E. Devlin. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*, 249(4967):404–406, 1990.

- [39] A. Doria, M. Zen, M. Canova, S. Bettio, N. Bassi, L. Nalotto, M. Rampudda, A. Ghirardello, and L. Iaccarino. SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev*, 10(1):55–60, 2010.
- [40] D. A. Dougan, R. L. Malby, L. C. Gruen, A. A. Kortt, and P. J. Hudson. Effects of substitutions in the binding surface of an antibody on antigen affinity. *Protein Eng*, 11(1):65–74, 1998.
- [41] X. Duburcq, C. Olivier, F. Malingue, R. Desmet, A. Bouzidi, F. Zhou, C. Auriault, H. Gras-Masse, and O. Melnyk. Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjug Chem*, 15(2):307–316, 2004.
- [42] D. B. Duggan, C. Mackworth-Young, A. Kari-Lefvert, J. Andre-Schwartz, D. Mudd, K. P. McAdam, and R. S. Schwartz. Polyspecificity of human monoclonal antibodies reactive with *Mycobacterium leprae*, mitochondria, ssDNA, cytoskeletal proteins, and the acetylcholine receptor. *Clin Immunol Immunopathol*, 49(3):327–340, 1988.
- [43] A. Dybwad, O. Førre, J. Kjeldsen-Kragh, J. B. Natvig, and M. Sioud. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol*, 23(12):3189–3193, 1993.
- [44] W.A. Eckert and J. Kartenbeck. Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. *Springer*, 1997.
- [45] M. Ehlers and J. V. Ravetch. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol*, 28(2):74–79, 2007.
- [46] M. Ehlers, H. Fukuyama, T. L. McGaha, A. Aderem, and J. V. Ravetch. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J. Exp. Med.*, 203(3):553–561, 2006.
- [47] K. E. Emblem, F. G. Zoellner, B. Tennoe, B. Nedregaard, T. Nome, P. Due-Tønnessen, J. K. Hald, D. Scheie, and A. Bjørnerud. Predictive modeling in glioma grading from MR perfusion images using support vector machines. *Magn Reson Med*, 60(4):945–952, 2008.
- [48] A. M. Ercolini and S.D. Miller. Role of immunologic cross-reactivity in neurological diseases. *Neurological Research*, 27:726–733, 2005.
- [49] V. Espina, E. C. Woodhouse, J. Wulfschle, H. D. Asmussen, E. F. Petricoin, and L. A. Liotta. Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J Immunol Methods*, 290(1-2):121–133, 2004.
- [50] E. Fehrenbach, D. Zieker, A. M. Niess, E. Moeller, S. Russwurm, and H. Northoff. Microarray technology—the future analyses tool in exercise physiology? *Exerc Immunol Rev*, 9:58–69, 2003.

- [51] L. G. Fägerstam, A. Frostell, R. Karlsson, M. Kullman, A. Larsson, M. Malmqvist, and H. Butt. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J Mol Recognit*, 3(5-6):208–214, 1990.
- [52] R. Frank. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J. Immunol. Methods*, 267(1):13–26, 2002.
- [53] S. A. Frank. *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. Princeton University Press, 2002.
- [54] S. A. Frank. Specificity and cross-reactivity. In *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. Princeton University Press, 2002.
- [55] R. Förch, H. Schönherr, and A. T. A. Jenkins. Surface design: applications in bioscience and nanotechnology. *Wiley-VCH*, 2009.
- [56] S. Gaseitsiwe, D. Valentini, S. Mahdavi, I. Magalhaes, D. F. Hoft, J. Zerweck, M. Schutkowski, J. Andersson, M. Reilly, and M. J. Maeurer. Pattern recognition in pulmonary tuberculosis defined by high content peptide microarray chip analysis representing 61 proteins from M. tuberculosis. *PLoS One*, 3(12):e3840, 2008.
- [57] J.P. Goddard and J.L. Reymond. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotechnol*, 15(4):314–322, 2004.
- [58] C.A. Golden. Overview of the state of the art of immunoassay screening tests. *J Am Vet Med Assoc*, 198(5):827–830, 1991.
- [59] D. N. Gosalia, C. M. Salisbury, J. A. Ellman, and S. L. Diamond. High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays. *Mol Cell Proteomics*, 4(5):626–636, 2005.
- [60] D. N. Gosalia, C. M. Salisbury, D. J. Maly, J. A. Ellman, and S. L. Diamond. Profiling serine protease substrate specificity with solution phase fluorogenic peptide microarrays. *Proteomics*, 5(5):1292–1298, 2005.
- [61] T. Greenhalgh. How to read a paper: Papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ*, 315:540–543, 1997.
- [62] S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3):1720–1730, 1999.
- [63] B. B. Haab. Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics*, 3(11):2116–2122, 2003.
- [64] B. B. Haab. Antibody arrays in cancer research. *Mol Cell Proteomics*, 4(4):377–383, 2005.
- [65] T. M. Harris, A. Massimi, and G. Childs. Injecting new ideas into microarray printing. *Nat Biotechnol*, 18(4):384–385, 2000.

- [66] W. E. Höhne, G. Kuttner, S. Kiessig, G. Hausdorf, R. Grunow, K. Winkler, H. Wessner, Giessmann E., R. Stigler, J. Schneider-Mergener, Von Baehr R., and D. Schomburg. Structural base of the interaction of a monoclonal antibody against p24 of HIV-1 with its peptide epitope. *Mol. Immunol.*, 30:1213–1221, 1993.
- [67] R. Hiller, S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, M. Chapman, R. Crameri, M. Duchêne, F. Ferreira, H. Fiebig, K. Hoffmann-Sommergruber, T. P. King, T. Kleber-Janke, V. P. Kurup, S. B. Lehrer, J. Lidholm, U. Müller, C. Pini, G. Reese, O. Scheiner, A. Scheynius, H. D. Shen, S. Spitzauer, R. Suck, I. Swoboda, W. Thomas, R. Tinghino, M. Van Hage-Hamsten, T. Virtanen, D. Kraft, M. W. Müller, and R. Valenta. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J*, 16(3):414–416, 2002.
- [68] S. Hochreiter and K. Obermayer. Classification and feature selection on matrix data with application to gene-expression analysis. In *54th Session of the International Statistical Institute*, 2003.
- [69] S. Hochreiter and K. Obermayer. Support vector machines for dyadic data. *Neural Comput*, 18(6):1472–510, 2006.
- [70] S. Hochreiter and K. Obermayer. Nonlinear Feature Selection with the Potential Support Vector Machine. In I. Guyon, S. Gunn, M. Nikravesh, and L. Zadeh, editors, *Feature Extraction, Foundations and Applications*, pages 419–438. Springer, 2006.
- [71] U. Hoffmüller, T. Knaute, M. Hahn, W. Höhne, J. Schneider-Mergener, and A. Kramer. Evolutionary transition pathways for changing peptide ligand specificity and structure. *Embo J.*, 19:4866–4874, 2000.
- [72] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, and M. Mrksich. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nature Biotechnology*, 20:270–274, 2002.
- [73] M. Holtzhauer (Hrsg.). Methoden in der Proteinanalytik. *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York*, 1996.
- [74] H. Huang and Y. Chen. Label-free reading of microarray-based proteins with high throughput surface plasmon resonance imaging. *Biosens Bioelectron*, 22(5):644–648, 2006.
- [75] R. A. Irizarry, D. Warren, F. Spencer, I. F. Kim, S. Biswal, Ronald Frank, B. C., E. Gabrielson, J. G. Garcia, J. Geoghegan, G. Germino, C. Griffin, S. C. Hilmer, E. Hoffman, A. E. Jedlicka, E. Kawasaki, F. Martinez-Murillo, L. Morsberger, H. Lee, E. Petersen, J. Quackenbush, A. Scott, M. Wilson, Y. Yang, S. Q. Ye, and W. Yu. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nature Methods*, 2(5):345–50, 2005.

- [76] J. E. Jackson. *A user's guide to principal components*. Wiley, Hoboken, N.J., 1991.
- [77] C. A. Janeway Jr. Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002.
- [78] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, and G. MacBeath. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*, 439(7073):168–74, 2006.
- [79] T. O. Joos, M. Schrenk, P. Höpfel, K. Kröger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schörner, M. Dürr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, and H. Hämmerle. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 21(13):2641–2650, 2000.
- [80] M. Kato and M. Mrksich. Using model substrates to study the dependence of focal adhesion formation on the affinity of integrin-ligand complexes. *Biochemistry*, 43(10):2699–2707, 2004.
- [81] T. Keitel, A. Kramer, H. Wessner, C. Scholz, J. Schneider-Mergener, and W. Höhne. Crystallographic analysis of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody cross-reactivity and polyspecificity. *Cell*, 91(6):811–820, 1997.
- [82] G. Köhler and C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497, 1975.
- [83] M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, P. Jonkhøj, S. Wetzel, R. Wacker, H. Schroeder, H. Prinz, C. M. Niemeyer, R. Breinbauer, S. E. Szedlacsek, and H. Waldmann. A microarray strategy for mapping the substrate specificity of protein tyrosine phosphatase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(40):7700–7703, 2007.
- [84] A. Kramer, T. Keitel, K. Winkler, W. Stocklein, W. Hohne, and J. Schneider-Mergener. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*, 91(6):799–809, 1997.
- [85] A. Kramer, R. D. Stigler, T. Knaute, B. Hoffmann, and J. Schneider-Mergener. Stepwise transformation of a cholera toxin and a p24 (HIV-1) epitope into D-peptide analogs. *Protein Eng.*, 11(10):941–948, 1998.
- [86] A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, and J. Schneider-Mergener. Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res*, 54(4):319–327, 1999.
- [87] M. Kurella, L. L. Hsiao, T. Yoshida, J. D. Randall, G. Chow, S. S. Sarang, R. V. Jensen, and S. R. Gullans. DNA microarray analysis of complex biologic processes. *J Am Soc Nephrol*, 12(5):1072–1078, 2001.
- [88] K.-B. Lee, S.-J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, and M. Mrksich. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science*, 295(5560):1702–1705, 2002.

- [89] M. L. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, and S. Q. Yao. Developing site-Specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(16):2079–2083, 2002.
- [90] M. Lipsitch and J. J. O’Hagan. Patterns of antigenic diversity and the mechanisms that maintain them. *J R Soc Interface*, 4(16):787–802, 2007.
- [91] D. J. Lockhart and E. A. Winzeler. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788):827–836, 2000.
- [92] F. Lolli, M. G. Colao, E. De Maio, M. Di Pietro, E. Galli, A. Grippo, F. Mazzotta, and F. Pinto. Intrathecal synthesis of anti-HIV antibodies in AIDS patients. *J Neurol Sci*, 99(2-3):281–289, 1990.
- [93] A. Lueking, D.J. Cahill, and S. Müllner. Protein biochips: A new and versatile platform technology for molecular medicine. *Drug Discov Today*, 10(11):789–794, 2005.
- [94] J. Luo, M. Schumacher, A. Scherer, D. Sanoudou, D. Megherbi, T. Davison, T. Shi, W. Tong, L. Shi, H. Hong, C. Zhao, F. Elloumi, W. Shi, R. Thomas, S. Lin, G. Tillinghast, G. Liu, Y. Zhou, D. Herman, Y. Li, Y. Deng, H. Fang, P. Bushel, M. Woods, and J. Zhang. A comparison of batch effect removal methods for enhancement of prediction performance using MAQC-II microarray gene expression data. *Pharmacogenomics J*, 10(4):278–291, 2010.
- [95] G. MacBeath and S. L. Schreiber. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289(5485):1760–1763, 2000.
- [96] R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 3(9):733–744, 2003.
- [97] J. W. Mandell. Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology. *Am J Pathol*, 163(5):1687–1698, 2003.
- [98] C. M. Mastroianni, G. M. Liuzzi, V. Vullo, E. Jirillo, S. Delia, and P. Riccio. Detection of cerebrospinal fluid antibodies against myelin basic protein in patients with AIDS dementia complex. *Mol Chem Neuropathol*, 14(3):227–236, 1991.
- [99] N. J. Maughan, F. A. Lewis, and V. Smith. An introduction to arrays. *J Pathol*, 195(1):3–6, 2001.
- [100] E. Meffre, A. Schaefer, H. Wardemann, P. Wilson, E. Davis, and M. C. Nussenzweig. Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. *J. Exp. Med.*, 199(1):145–150, 2004.
- [101] G. A. Michaud, M. Salcius, F. Zhou, R. Bangham, J. Bonin, H. Guo, M. Snyder, P. F. Predki, and B. I. Schweitzer. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nature Biotechnology*, 21(12):1509–1512, 2003.

- [102] J. C. Miller, H. Zhou, J. Kwekel, R. Cavallo, J. Burke, E. B. Butler, B. S. Teh, and B. B. Haab. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics*, 3(1):56–63, 2003.
- [103] P.G. Miotti. Rapid methods for the molecular diagnosis of infectious diseases: current trends and applications. *Eur J Epidemiol*, 3(4):356–364, 1987.
- [104] K. Mohrs, D. P. Harris, F. E. Lund, and M. Mohrs. Systemic dissemination and persistence of Th2 and type 2 cells in response to infection with a strictly enteric nematode parasite. *J Immunol*, 175(8):5306–5313, 2005.
- [105] A. K. M. Ghulam Muhammad, M. Candolfi, G. D. King, K. Yagiz, D. Foulad, Y. Mineharu, K. M. Kroeger, K. A. Treuer, W. S. Nichols, N. S. Sanderson, J. Yang, M. Khayznikov, N. Van Rooijen, P. R. Lowenstein, and M. G. Castro. Antiglioma immunological memory in response to conditional cytotoxic/immune-stimulatory gene therapy: humoral and cellular immunity lead to tumor regression. *Clin Cancer Res*, 15(19):6113–6127, 2009.
- [106] T. Nagel, N. Gajovic-Eichelmann, S. Tobisch, U. Schulte-Spechtel, and F. F. Bier. Serodiagnosis of Lyme borreliosis infection using surface plasmon resonance. *Clin Chim Acta*, 394(1-2):110–113, 2008.
- [107] T. Nahtman, A. Jernberg, S. Mahdavifar, J. Zerweck, M. Schutkowski, M. Maeurer, and M. Reilly. Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *J Immunol Methods*, 328(1-2):1–13, 2007.
- [108] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Biochemie. 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York*, 2005.
- [109] Y. Ngo, R. Advani, D. Valentini, S. Gaseitsiwe, S. Mahdavifar, M. Maeurer, and M. Reilly. Identification and testing of control peptides for antigen microarrays. *J Immunol Methods*, 343(2):68–78, 2009.
- [110] U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger. Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J Immunol Methods*, 290(1-2):107–120, 2004.
- [111] G. J. V. Nossal. The double helix and immunology. *Nature*, 421(6921):440–444, 2003.
- [112] G.J. Nossal. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell*, 68(1):1–2, 1992.
- [113] A. F. Ochsenbein and R. M. Zinkernagel. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*, 21(12):624–30, 2000.
- [114] T. Okamoto, T. Suzuki, and N. Yamamoto. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol*, 18(4):438–441, 2000.

- [115] L. C. Olds and J. J. Miller. Antibodies to core lipid fractions of endotoxin in children with rheumatic disease. *Acta Univ Carol [Med] (Praha)*, 37(1-2):37–40, 1991.
- [116] P. Ordoñez, S. Gea, D. Iosa, and E. Vottero-Cima. Chagas’ disease: polyspecificity of antibodies against *Trypanosoma cruzi* acidic antigens. *Acta Trop*, 59(2):93–103, 1995.
- [117] P. Pattnaik. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl Biochem Biotechnol*, 126(2):79–92, 2005.
- [118] W. F. Patton. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*, 21(6):1123–1144, 2000.
- [119] J. L. Pellequer, E. Westhof, and M. H. Van Regenmortel. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods Enzymol*, 203:176–201, 1991.
- [120] C. Pinilla, S. Chendra, J. R. Appel, and R. A. Houghten. Elucidation of monoclonal antibody polyspecificity using a synthetic combinatorial library. *Pept Res*, 8(5):250–257, 1995.
- [121] G. Pöpperl, F. W. Kreth, J. Herms, W. Koch, J. H. Mehrkens, F. J. Gildehaus, H. A. Kretzschmar, J. C. Tonn, and K. Tatsch. Analysis of 18F-FET PET for grading of recurrent gliomas: is evaluation of uptake kinetics superior to standard methods? *J Nucl Med*, 47(3):393–403, 2006.
- [122] P. F. Predki, D. Mattoon, R. Bangham, B. Schweitzer, and G. Michaud. Protein microarrays: A new tool for profiling antibody cross-reactivity. *Human Antibodies*, 14:7–15, 2005.
- [123] F. J. Quintana and I. R. Cohen. Autoantibody patterns in diabetes-prone NOD mice and in standard C57BL/6 mice. *J Autoimmun*, 17(3):191–7, 2001.
- [124] F. J. Quintana, P. H. Hagedorn, G. Elizur, Y. Merbl, E. Domany, and I. R. Cohen. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 Suppl 2:14615–21, 2004. Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t United States.
- [125] F. J. Quintana, M. F. Farez, V. Viglietta, A. H. Iglesias, Y. Merbl, G. Izquierdo, M. Lucas, A. S. Basso, S. J. Khoury, C. F. Lucchinetti, I. R. Cohen, and H. L. Weiner. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(48):18889–18894, 2008.

- [126] Z. S. M. Rahman, H. Niu, D. Perry, E. Wakeland, T. Manser, and L. Morel. Expression of the autoimmune Fcgr2b NZW allele fails to be upregulated in germinal center B cells and is associated with increased IgG production. *Genes Immun*, 8(7):604–612, 2007.
- [127] D. F. Ransohoff. Promises and limitations of biomarkers. *Recent Results Cancer Res*, 181:55–59, 2009.
- [128] J. V. Ravetch and S. Bolland. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 19:275–290, 2001.
- [129] U. Reineke, C. Ivascu, M. Schlieff, C. Landgraf, S. Gericke, G. Zahn, H. Herzel, R. Volkmer-Engert, and J. Schneider-Mergener. Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences. *J Immunol Methods*, 267(1):37–51, 2002.
- [130] R. L. Rich, M. J. Cannon, J. Jenkins, P. Pandian, S. Sundaram, R. Magyar, J. Brockman, J. Lambert, and D. G. Myszka. Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems. *Anal Biochem*, 373(1):112–120, 2008.
- [131] D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*, 28(6):595–599, 2010.
- [132] H. S. Ro, B. H. Koh, S. O. Jung, H. K. Park, Y. B. Shin, M. G. Kim, and B. H. Chung. Surface plasmon resonance imaging protein arrays for analysis of triple protein interactions of HPV, E6, E6AP, and p53. *Proteomics*, 6(7):2108–2111, 2006.
- [133] W. H. Robinson, C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skrinier, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, and P. J. Utz. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*, 8(3):295–301, 2002.
- [134] D.L. Sackett, R.B. Haynes, G.H. Guyatt, and P. Tugwell. Clinical Epidemiology: a Basic Science for Clinical Medicine. *Little Brown, Chicago*, 1991.
- [135] M. Schener. Microarray Biochip Technology. *Eaton Publishing Company*, 2000.
- [136] M. Schener. Protein Microarrays. *Jones and Bartlett Learning*, 2004.
- [137] M. Schäferling and S. Nagl. Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Anal Bioanal Chem*, 385(3):500–517, 2006.

- [138] M. Schutkowski, U. Reimer, S. Panse, L. Dong, J. M. Lizcano, D. R. Alessi, and J. Schneider-Mergener. High-content peptide microarrays for deciphering kinase specificity and biology. *Angewandte Chemie*, 116(20):2725–2728, 2004.
- [139] M. Schutkowski, U. Reineke, and U. Reimer. Peptide arrays for kinase profiling. *ChemBioChem*, 6(3):513–521, 2005.
- [140] M. Schwartz and J. Kipnis. Self and non-self discrimination is needed for the existence rather than deletion of autoimmunity: the role of regulatory T cells in protective autoimmunity. *Cell Mol Life Sci*, 61(18):2285–2289, 2004.
- [141] B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. T. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca, and S. F. Kingsmore. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol*, 20(4):359–365, 2002.
- [142] Y. Sherer, A. Gorstein, M. J. Fritzler, and Y. Shoenfeld. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum*, 34(2):501–537, 2004.
- [143] T. Shimomura, X. Han, A. Hata, T. Niidome, T. Mori, and Y. Katayama. Optimization of peptide density on microarray surface for quantitative phosphoproteomics. *Anal Sci*, 27(1):13–17, 2011.
- [144] A. A. Silva, V. Câmara, and T. Quirico-Santos. Intrathecal reactivity for myelin components precedes development of neurological symptoms in AIDS patients. *Arch Med Res*, 28(3):391–396, 1997.
- [145] N. Sinha, S. Mohan, C. A. Lipschultz, and S. J. Smith-Gill. Differences in electrostatic properties at antibody-antigen binding sites: Implications for specificity and cross-reactivity. *Biophys. J.*, 83(6):2946–2968, 2002.
- [146] M. Sudol. From Src Homology domains to other signalling modules: proposal of the "protein recognition code". *Oncogene*, 17(11):1469–74, 1998.
- [147] V. Tapia, J. Bongartz, M. Schutkowski, N. Bruni, A.A. Weiser, B. Ay, R. Volkmer, and M. Or-Guil. Affinity profiling using the peptide microarray technology: A case study. *Analytical Biochemistry*, 363(1):108–118, 2007.
- [148] S.L. Taylor, J. A. Nordlee, L. M. Niemann, and D.M. Lambrecht. Allergen immunoassays—considerations for use of naturally incurred standards. *Anal Bioanal Chem*, 395(1):83–92, 2009.
- [149] T. Tiller, M. Tsuiji, S. Yurasov, K. Velinzon, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*, 26(2):205–213, 2007.
- [150] T. Tiller, E. Meffre, S. Yurasov, M. Tsuiji, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single

- p>cell RT-PCR and expression vector cloning.
- J Immunol Methods*
- , 329(1-2):112–124, 2008.
- [151] T. Tiller, J. Kofer, C. Kreschel, C. E. Busse, S. Riebel, S. Wickert, F. Oden, M. M. M. Mertes, M. Ehlers, and H. Wardemann. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J Exp Med*, 207(12):2767–2778, 2010.
 - [152] S. Tonegawa. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity. *Scand J Immunol*, 38(4):303–319, 1993.
 - [153] M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, M.-L. Lesaichere, and S. Q. Yao. Site-specific peptide immobilization strategies for the rapid detection of kinase activity on microarrays. *Methods Mol Biol*, 264:191–204, 2004.
 - [154] S. Vafaei, D. Wen, and T. Borca-Tasciuc. Nanofluid surface wettability through asymptotic contact angle. *Langmuir*, 2011.
 - [155] R. P. van Gijlswijk, E. G. Talman, P. J. Janssen, S. S. Snoeijers, J. Killian, H. J. Tanke, and R. J. Heetebrij. Universal Linkage System: versatile nucleic acid labeling technique. *Expert Rev Mol Diagn*, 1(1):81–91, 2001.
 - [156] A. J. Vegas, J. H. Fuller, and A. N. Koehler. Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery. *Chem Soc Rev*, 37(7):1385–1394, 2008.
 - [157] S. Wan, C. Xia, and L. Morel. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions. *J Immunol*, 178(1):271–279, 2007.
 - [158] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, and A. Wang. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat Biotechnol*, 20(3):275–281, 2002.
 - [159] H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, and M. C. Nussenzweig. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 301(5638):1374–1377, 2003.
 - [160] T. W. Way, B. Sahiner, L. M. Hadjiiski, and H.-P. Chan. Effect of finite sample size on feature selection and classification: a simulation study. *Med Phys*, 37(2):907–920, 2010.
 - [161] G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, and R. C. Stevens. Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science*, 276(5319):1665–1669, 1997.
 - [162] A. A. Weiser. Amino acid substitutions in protein binding: A study for peptides and antibodies. *Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin*, 2009.

- [163] A. A. Weiser, M. Or-Guil, V. Tapia, A. Leichsenring, J. Schuchhardt, C. Frommel, and R. Volkmer-Engert. SPOT synthesis: Reliability of array-based measurement of peptide binding affinity. *Analytical Biochemistry*, 342(2):300–311, 2005.
- [164] H. Wenschuh, H. Gausepohl, L. Germeroth, M. Ulbricht, H. Matuschewski, A. Kramer, R. Volkmer-Engert, N. Heine, T. Ast, D. Scharn, and J. Schneider-Mergener. Positionally addressable parallel synthesis on continuous membranes. *Combinatorial Chemistry: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, UK, pages 95–116, 2000.
- [165] R. L. Woodbury, S. M. Varnum, and R. C. Zangar. Elevated HGF levels in sera from breast cancer patients detected using a protein microarray ELISA. *J Proteome Res*, 1(3):233–237, 2002.
- [166] M. Yamada, A. Zurbriggen, M. B. Oldstone, and R. S. Fujinami. Common immunologic determinant between human immunodeficiency virus type 1 gp41 and astrocytes. *J Virol*, 65(3):1370–1376, 1991.
- [167] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, and M. Snyder. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet*, 26(3):283–289, 2000.
- [168] H. Zhu, M. Bilgin, and M. Snyder. Proteomics. *Annu Rev Biochem*, 72:783–812, 2003.
- [169] M. Ziegner, G. Steinhauser, and C. Berek. Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol*, 24(10):2393–2400, 1994.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Antikörper	3
1.2	Herstellung von Peptid-Mikroarrays	10
1.3	MRT Bilder von A-II und A-IV Tumoren	14
1.4	Serumantikörperbindungsprofile	16
1.5	Analyseweg zur Unterscheidung von Antikörperbindungsprofilen	17
4.1	CB4-1 Peptidbibliothek und Mikroarray Design	39
4.2	Intra-Mikroarray-Variabilität	41
4.3	Inter-Mikroarray-Variabilität	43
4.4	Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays	45
4.5	Genauigkeit quantitativer Bindungsstudien mit Peptid-Mikroarrays bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen	46
4.6	Quantitative Bestimmung von Affinität mit Peptid-Mikroarrays	49
4.7	Qualitative Bestimmung von Affinität mit Peptid-Mikroarrays	50
4.8	Messung von Serumantikörper-Peptid-Interaktionen mit Peptid-Mikroarrays	52
4.9	Einfluss verschiedener Peptidbibliotheken auf die Signalintensität	54
4.10	Einfluss von Blockierung mit BSA auf die Signalintensität	56
4.11	Beiträge zum Fluoreszenzsignal	60
4.12	Einfluss von Sekundärantikörpermischungen auf die Signalintensität	62
4.13	Einfluss der Bedingungen bei der Signalintensitätsbestimmung auf die Signalintensität	64
4.14	Signalintensitätsverteilung	65
4.15	Messbarer Signalintensitätsbereich	66
4.16	Hintergrundsignalintensität	66
4.17	Standardabweichung der Signalintensität	67
4.18	Messung der Polyreaktivität monoklonaler Antikörper	71
4.19	Polyreaktivität monoklonaler Antikörper und Antikörpermischungen	73
4.20	Aminosäurezusammensetzung gebundener Peptide	74
5.1	Seren gesunder und <i>H.polygyrus</i> infizierter Mäuse	83
5.2	LDA zur Klassifizierung von gesunden C57BL/6, gesunden BALB/c und <i>H.polygyrus</i> -infizierten BALB/c Mäusen	85
5.3	Seren gesunder und autoimmuner Mäuse	87
5.4	Hauptkomponentenanalyse SLE	88
5.5	Signalintensitäten selektierter Peptide	89
5.6	Hauptkomponentenanalyse gesunder und kranker Fc γ RIIB ^{-/-} .B6 Mäuse	90

5.7	Seren von <i>nA</i> - und <i>hA</i> - Patienten	92
5.8	Eigenschaften der IgM-Bindungssignalintensitäten von <i>nA</i> - und <i>hA</i> - Individuen	94
5.9	Hauptkomponentenanalyse Astrozytom	95
1	SDS-PAGE	110
2	Signalintensitätshistogramme der CB4-1-Bindungssignale auf vier Glasträgertypen	116
3	Signalintensitätshistogramme der CB4-1-Bindungssignale bei fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen	117
4	Plotmatrix der IgM-Bindungssignale von 14 repetitiven Inkubationen des humanen Kontrollserums K13	118
5	Signalintensitätshistogramme der Bindungssignale monoklonaler Antikörper	119
6	Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von Serumantikörpern und von monoklonalen Antikörpern	120
7	Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von 15 gesunden C57BL/6 Mäusen	126
8	Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von 15 gesunden C57BL/6 Mäusen	127
9	Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von 15 gesunden BALB/c Mäusen	128
10	Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von 15 gesunden BALB/c Mäusen	129
11	Signalintensitätshistogramme der IgG-Bindungssignale von infizierten BALB/c Mäusen (14dpi)	130
12	Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von infizierten BALB/c Mäusen (14dpi)	131
13	Signalintensitätshistogramme der IgG2c-Bindungssignale von gesunden und autoimmunen Individuen	134
14	Signalintensitätshistogramme der IgG2b-Bindungssignale von gesunden und autoimmunen Individuen	135
15	Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von <i>hA</i> -Patienten	140
16	Signalintensitätshistogramme der IgM-Bindungssignale von <i>nA</i> -Patienten	141

Tabellenverzeichnis

3.2	Astrozytompatienten	26
3.3	Sequenzdaten von IgG ⁺ Gedächtnis B-Zellen	27
3.4	PCR-Programm	28
3.5	Konzentration und Reaktivität der Antikörper aus IgG ⁺ Gedächtnis-B-Zellen des gesunden Spenders PN	30
3.6	Sequenzen der CB4-1 Peptidbibliothek	32
3.7	Aminosäurezusammensetzung der Zufallspeptidbibliotheken	33
4.1	Intra-Mikroarray-Variabilität und Reproduzierbarkeit von <i>SI</i> -Messungen .	42
4.2	Regressionskoeffizienten pK_D vs. <i>SI</i>	45
4.3	Regressionskoeffizienten	48
4.4	Vorhersagegenauigkeit der Bestimmung von Affinitätsklassen mit dem p-Wert	51
4.5	Vorhersagegenauigkeit der Bestimmung von Affinitätsklassen mit SNR>3	51
4.6	Signifikanzwerte	57
4.7	Serumverdünnung	57
4.8	Sekundärantikörperkonzentration	58
4.9	Reproduzierbarkeit von Signalintensitätsmessungen an verschiedenen Tagen	68
4.10	Reproduzierbarkeit von Signalintensitätsmessungen von verschiedenen Mikroarraychargen	68
4.11	Konzentration und Reaktivität der Antikörper aus IgG ⁺ Gedächtnis-B-Zellen der gesunden Spender PN und VB	69
5.1	Sequenzen der Peptide zur Klassifizierung von gesunden C57 BL/6, gesunden BALB/c und <i>H.polygyrus</i> -infizierten BALB/c Mäusen	84
5.2	Klassifizierung und Vorhersage von gesunden C57BL/6, gesunden BALB/c und <i>H.polygyrus</i> -infizierten BALB/c Mäusen	86
5.3	Klassifizierung und Vorhersage der IgG2b- und IgG2c- Autoantikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und autoimmunen FcγRIIB ^{-/-} .B6 Mäusen	89
5.4	Sequenzen der Peptide zur Klassifizierung der IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperrepertoires von gesunden C57BL/6 und autoimmunen FcγRIIB ^{-/-} .B6 Mäusen	89
5.5	Klassifizierung der IgM-Antikörperrepertoires von Astrozytompatienten .	96
1	Antikörperexpression: experimentelle Daten	110
2	Sekundärantikörpermarkierung: experimentelle Daten	110
3	Astrozytompatienten	111

4	Regressionskoeffizienten Gauss Fitting	112
5	BLAST Ergebnisse	113
6	von PN46 _{rev} erkannte Peptide	121
7	von PN46 _{rev} + Serum erkannte Peptide	123
8	Peptide für Merkmalsselektion zur Diagnose von <i>H.polygyrus</i>	132
9	Peptide für Merkmalsselektion zur Diagnose von SLE IgG2b	136
10	Peptide für Merkmalsselektion zur Diagnose von SLE IgG2c	138

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Technologische Bewertung von Peptid-Mikroarrays als Methode der serologischen Diagnostik“ selbständig und ohne Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche Hilfsmittel, Hilfen sowie Literaturquellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe mich anderweitig nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze auch keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 21.07.2011

Juliane Lück